

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. R. Müller
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Vergleichende Analysen der nukleär/zytoplasmatischen Exporteigenschaften von SR-ähnlichen Proteinen und ihre regulatorische Funktion im mRNA Spleißing-Prozess

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der
Humanbiologie
(Dr. rer. nat.)

Dem Fachbereich Medizin der



vorgelegt

von

Alexandra Hackmann

aus

Haselünne

Marburg an der Lahn, Juli 2010

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität als Dissertation am 09.11.2010
angenommen.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. Heike Krebber

1. Korreferent: Prof. Dr. Ralf Jacob

2. Korreferent: Prof. Dr. Robert Grosse

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Inhaltsverzeichnis | 4 |
| 1. Einleitung..... | 8 |
| 1.1 Zellkern (Nukleus) und Kernmembran | 8 |
| 1.2 Zellkernkörperchen (Nukleolus) | 9 |
| 1.3 Der Kernporen Komplex | 9 |
| 1.4 Der Kernporentransport | 11 |
| 1.5 Der Karyopherin vermittelte Kerntransport..... | 13 |
| 1.6 Die Ribosomen-Biogenese und der nukleärer Export der präribosomalen Untereinheiten | 14 |
| 1.7 mRNA Prozessierung und Transport | 17 |
| 1.7.1 mRNA Biogenese und Prozessierung von mRNA..... | 18 |
| 1.7.2 5'-Kappenstruktur | 18 |
| 1.7.3 Prä-mRNA Spleißing | 19 |
| 1.7.3.1 Die Spleißing-Reaktion | 20 |
| 1.7.3.2 Die U snRNP Assemblierung zum funktionalen Spleißosom..... | 21 |
| 1.7.4 3'-Endprozessierung und Polyadenylierung | 25 |
| 1.7.5 mRNA Export..... | 26 |
| 1.8 Die Familie der SR-Proteine in höheren Eukaryonten..... | 28 |
| 1.9 Die Familie der SR-ähnlichen Proteine in <i>S. cerevisiae</i> | 29 |
| 1.10 Npl3p..... | 30 |
| 1.11 Gbp2p | 31 |
| 1.12 Hrb1p | 32 |
| 1.13 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit..... | 33 |
| 2. Material und Methoden | 35 |
| 2.1 Geräte | 35 |
| 2.2 Chemikalien..... | 37 |
| 2.3 Reaktionssysteme | 38 |
| 2.4 Enzyme und Antikörper | 38 |
| 2.5 Stämme | 39 |
| 2.5.1 <i>Escherichia coli</i> Stämme..... | 39 |
| 2.5.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Stämme..... | 39 |
| 2.6 Plasmide..... | 43 |
| 2.7 Oligonukleotide..... | 44 |
| 2.8 Molekularbiologische Methoden | 45 |

| | |
|---|----|
| 2.8.1 Kultivierung von <i>E. coli</i> | 45 |
| 2.8.2 Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> | 46 |
| 2.8.3 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen..... | 49 |
| 2.8.4 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente <i>E. coli</i> Zellen | 50 |
| 2.8.5 Selektionsverfahren zur Identifizierung positiver Transformanten | 50 |
| 2.8.6 Isolierung von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i> Zellen | 50 |
| 2.8.7 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren | 51 |
| 2.8.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)..... | 51 |
| 2.8.9 Agarose Gelelektrophorese | 53 |
| 2.8.10 Elution von DNA aus Agarosegelen | 53 |
| 2.8.11 Sequenzspezifische Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen | 54 |
| 2.8.12 Dephosphorylierung von 5'-DNA Fragment-Enden | 54 |
| 2.8.13 Ligation von DNA-Fragmenten..... | 54 |
| 2.8.14 Klonierung von PCR Fragmenten in pGEM®-T..... | 55 |
| 2.9 Experimentelles Arbeiten mit <i>S. cerevisiae</i> | 56 |
| 2.9.1 Hocheffiziente Transformation von Plasmid DNA (Gietz <i>et al.</i> , 1992)..... | 56 |
| 2.9.2 Extraktion von Plasmid-DNA..... | 57 |
| 2.9.3 Wachstumsanalyse von <i>S. cerevisiae</i> | 58 |
| 2.9.4 Isolierung von genomischer DNA (gDNA) | 58 |
| 2.9.5 Isolierung von Gesamt-RNA | 59 |
| 2.9.6 Sporulation und Tetradendisektion..... | 59 |
| 2.10 Protein-biochemische und zellbiologische Methoden..... | 60 |
| 2.10.1 Ko-Immunopräzipitation | 60 |
| 2.10.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) | 62 |
| 2.10.3 Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf Membranen | 63 |
| 2.10.4 Mikroskopische Lokalisationsstudien von GFP-Fusionsproteinen | 65 |
| 2.10.5 GFP-Fluoreszenz-Messungen | 66 |
| 2.10.6 β -Galaktosidase Aktivitätsmessungen von Reporterkonstrukten..... | 67 |
| 2.11 RNA-biologische Methoden..... | 68 |
| 2.11.1 Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung (FISH) | 68 |
| 2.11.2 Northern Blot..... | 70 |
| 2.11.3 RNA-Immunopräzipitation..... | 72 |
| 2.11.4 RNA Präzipitation..... | 74 |
| 2.11.5 RNA Qualitätskontrolle mit Hilfe des Bio-Rad Experion™ | 74 |
| 2.11.6 Reverse Transkription..... | 75 |
| 2.11.7 RNA Amplifikation..... | 75 |
| 2.11.8 Microarray..... | 75 |

| | |
|--|-----|
| 2.11.9 Quantitative RT-PCR (qRT-PCR bzw. "real time" PCR)..... | 78 |
| 3.0 Ergebnisse..... | 80 |
| 3.1 Die Bedeutung von <i>NPL3</i> im Transportprozess von mRNAs und der prä-60S Untereinheit..... | 80 |
| 3.1.2 Eine Deletion von <i>NPL3</i> führt nicht zu mRNA Export-Defekten..... | 81 |
| 3.1.3 Eine Deletion von <i>NPL3</i> bewirkt keine signifikanten Störungen im Transkriptionsablauf..... | 84 |
| 3.1.4 Eine Deletion von <i>NPL3</i> führt zu Defekten in der Proteinneusynthese..... | 87 |
| 3.1.5 Eine <i>NPL3</i> Deletion bewirkt nukleäre Export-Defekte für die ribosomale prä-60S Untereinheit | 88 |
| 3.1.6 <i>NPL3</i> interagiert physikalisch mit Komponenten der ribosomalen prä-60S Untereinheit..... | 90 |
| 3.1.5 Npl3p agiert als unabhängiger Exportfaktor im nukleären Export der prä-60S Untereinheit | 94 |
| 3.2 Die SR-ähnlichen Proteine Gbp2p und Hrb1p vermitteln den nukleären Export gespleißter mRNAs | 101 |
| 3.2.1 Gbp2p, Hrb1p und Npl3p sind Export-Adapter für den Export-Rezeptor Mex67p | 101 |
| 3.2.2 Genetische Interaktionen zwischen den SR-ähnlichen Proteinen <i>NPL3</i> , <i>GBP2</i> und <i>HRB1</i> | 103 |
| 3.2.3 Identifizierung neuer Export-relevanter Faktoren für die SR-ähnlichen Proteine Npl3p, Gbp2p und Hrb1p..... | 105 |
| 3.2.3 Spleißing-Faktor Mutanten führen zu Export-Defekten von Gbp2p und Hrb1p... | 110 |
| 3.2.4 Genetische und physikalische Interaktionen von Gbp2p und Hrb1p mit Spleißingfaktor Mutanten | 114 |
| 3.2.4 Die synthetische Letalität von <i>skyΔ prp17Δ</i> wird über das Sky1p Substrat Gbp2p vermittelt | 120 |
| 3.2.5 <i>GBP2</i> und <i>HRB1</i> Deletionen führen zu starken Expressionsabnahmen von Intron-haltigen Gene | 123 |
| 3.2.6 Additive synthetische mRNA Export-Defekte von Spleißingfaktor Mutanten in Kombination mit <i>gbp2Δ</i> , <i>hrb1Δ</i> und <i>npl3Δ</i> | 129 |
| 3.2.7 Spleißing-abhängige Rekrutierung von Gbp2p und Hrb1p zur mRNA..... | 131 |
| 3.2.8 Spleißing-abhängige Rekrutierung des Export Rezeptors Mex67p an die Export Adaptoren Gbp2p und Hrb1p..... | 140 |
| 3.2.9 Gbp2p und Hrb1p interagieren physikalisch mit dem Kernporen-Komplex assoziierten Mlp1p..... | 143 |
| 3.2.10 Physikalische Protein-Protein Wechselwirkung von Gbp2p mit Hrb1p..... | 144 |

| | |
|---|-----|
| 3.2.11 Gbp2p und Hrb1p binden Intron-haltige Transkripte..... | 144 |
| 4.0 Diskussion | 152 |
| 4.1 Npl3p ist ein neu identifizierter Export relevanter Faktor für den Transport der prä-60S Untereinheit..... | 153 |
| 4.1.1 Npl3p interagiert direkt mit der prä-60S Untereinheit | 155 |
| 4.1.2 Npl3p ist unabhängig von Mex67p-Mtr2p und Nmd3p-Xpo1p am Export-Prozess der ribosomalen prä-60S-Untereinheit beteiligt | 156 |
| 4.2 Vergleichende Analysen der nukleär/zytoplasmatischen Export-Eigenschaften der SR-ähnlichen Proteine Npl3p, Gbp2p und Hrb1p..... | 159 |
| 4.2.1 Gbp2p und Hrb1p unterstützen als neu identifizierte Export-Adaptoren den mRNA Export-Prozess..... | 159 |
| 4.2.2 Der Export-„Screen“: Identifizierung neuer Export relevanter Faktoren für Npl3p, Gbp2p und Hrb1p..... | 160 |
| 4.2.3 Im Export Screen identifizierte Spleißingfaktoren bewirken Export-Defekte für Gbp2p und Hrb1p | 160 |
| 4.2.4 Gbp2p und Hrb1p interagieren genetisch und physikalisch mit Spleißingfaktoren der Spleißing-Spätphase | 162 |
| 4.2.5 Die Rekrutierung von Gbp2p und Hrb1p zur mRNA ist Spleißing-abhängig | 164 |
| 4.2.6 Eine Überexpression von Gbp2p supprimiert den synthetisch Letaleffekt zwischen <i>sky1Δ</i> und <i>prp17Δ</i> | 166 |
| 4.2.7 Deletionen der SR-ähnlichen Proteine führen zu leichten Spleißing-Defekten ... | 168 |
| 4.2.8 Deletionen von <i>GBP2</i> und <i>HRB1</i> führen zu starken Expressionsabnahmen von Intron-haltigen Genen | 168 |
| 4.2.9 Gbp2p und Hrb1p binden preferentiell die Gruppe der gespleißten mRNAs | 170 |
| 4.2.10 Gbp2p und Hrb1p vermitteln den nukleären Export von gespleißten mRNAs . | 173 |
| 4.2.11 Gbp2p und Hrb1p sind neu identifizierte Interaktionspartner von Mlp1p..... | 173 |
| 5. Literaturverzeichnis..... | 176 |
| 6. Abkürzungsverzeichnis..... | 196 |
| 7. Zusammenfassung..... | 200 |
| 8. Summary | 202 |
| I. Lebenslauf..... | 204 |
| II. Akademische Lehrer..... | 205 |
| III. Danksagung | 206 |
| IV. Ehrenwörtliche Erklärung | 207 |

1. Einleitung

Ein kritischer Schritt auf dem Weg der Genexpression ist der mRNA („messenger RNA“ = Boten-RNA) vermittelte Transfer der genetischen Information vom Genom zur Proteinbiosynthese. In eukaryontischen Zellen ist das Genom in einem von einer Doppelmembran umhüllten Zellkern lokalisiert. In diesem Kompartiment erfolgt die RNA Polymerase II vermittelte Transkription der DNA zur prä-mRNA. Diese erfährt eine extensive Prozessierung, in dessen Verlauf sie zur gereiften, von Intron befreiten mRNA umgeformt wird, die dann für die Proteinbiosynthese in das Zytoplasma transportiert wird. Diese räumliche und zeitliche Trennung von Transkription und Translation ermöglicht eine komplexe Regulation der Genexpression, welche zur eukaryontischer Funktionenvielfalt und Stabilität beiträgt. Die zelluläre Kompartimentierung erfordert den selektiven Transport vollständig prozessierter und gespleißter mRNA, während unreife und vor allem ungespleißte prä-mRNAs im Zellkern zurückgehalten werden müssen, um deren fehlerhafte Translation im Zytoplasma zu verhindern. Die Assoziation der mRNA mit Prozessierungsfaktoren verhindert in der Regel den Export unreifer prä-mRNA. Darüberhinaus existieren Kontrollinstanzen, die fehlerhafte mRNAs erkennen und den Degradationsmechanismen zuführen. Dennoch beruhen in vielen Fällen die Entstehung von neurodegenerativen Krankheiten, Krebs und Zelltod auf der Translation von Intron-haltigen oder fehlerhaft prozessierten mRNAs, da sie zur Expression schädigender Genprodukte führen können (Musunuru, 2003; Stoilov *et al.*, 2002). Ein wichtiges Ziel ist es daher zu verstehen wie Komponenten der Transkriptions- und Exportmaschinerie koordiniert zusammenarbeiten und zwischen reifer und unreifer mRNA unterscheiden können. Schlüsselfaktoren dieser Prozesse sind eine Vielzahl von mRNA Bindeproteinen sowie Exportfaktoren.

1.1 Zellkern (Nukleus) und Kernmembran

Die Kernhülle besteht aus einer doppelten Membran, die den Zellkern gegen das umliegende Zytoplasma abgrenzt. Die äußere zum Zytoplasma gewandte Elementarmembran geht kontinuierlich in das raue endoplasmatische Retikulum (ER) über und verbindet so Zellkernplasma und Zytoplasma. Die äußere Membran verbindet sich an den Stellen der Kernporen-Komplexe mit der inneren Elementarmembran und bildet somit außerhalb der Kernporenregion ein geschlossenes Kompartiment. Zwischen diesen beiden Membranen bildet sich der sog. perinukleäre Raum. Der Zellkern bzw. das Zellkernplasma besteht überwiegend aus Chromatin, einem Komplex aus DNA und Proteinen und enthält das sog. Zellkernkörperchen (Nukleolus). Die mRNA, die im Zellkern an der DNA-Matrize

synthetisiert wird, gelangt in Form von Ribonukleoprotein Komplexen („ribonucleoprotein“ = RNP) durch die Kernporen-Komplexe („nuclear pore complex“ = NPC) in das Zytoplasma.

1.2 Zellkernkörperchen (Nukleolus)

Der Nukleolus bildet einen diskreten subnukleären Bereich, in dem hauptfunktional die Biogenese der ribosomalen Vorläuferstrukturen stattfindet, die später im Zytoplasma zum funktionsfähigen Ribosom, der Translationseinheit, assoziieren. Dieser Prozess umfaßt u.a., die durch die RNA Polymerase I vermittelte Transkription der ribosomalen DNA (rDNA) zu ribosomaler RNA (rRNA), sowie die rRNA Prozessierung. Des weiteren assemblieren im Nukleolus rRNA und importierte ribosomale Proteine zu einem ribosomalen Vorläuferkomplex (1.6). Der Nukleolus grenzt sich strukturell nicht durch eine Membran ab, sondern bildet einen subnukleären Bereich, der sich durch teilweise voneinander abgegrenzten granulären und dichten fribillären Komponenten auszeichnet (Lo *et al.*, 2006).

1.3 Der Kernporen-Komplex

Der nukleozytoplasmatische Austausch von Proteinen, RNAs, kleineren Molekülen und Ionen wird von den Kernporen-Komplexen vermittelt, die in der Kernhülle integriert sind (Görllich & Kutay, 1999; Conti & Izaurralde, 2001; Lim & Fahrenkrog, 2006; Tran & Wente, 2006). Diese hochmolekularen Kernporen-Komplexe, die zu den größten Zellstrukturen gehören, sind evolutionär hochkonserviert (Franke & Scheer, 1970; Stoffler *et al.*, 1999a; Lim *et al.*, 2008). Je nach Größe und Aktivität einer proliferierenden Zelle kann die Kernhülle von bis zu 200 Kernporen-Komplexen in Hefe und etwa 4000 in Säugetierzellen durchsetzt sein (Rout & Blobel, 1993; Maul, 1977). Während kleinere Moleküle und Ionen bis zu einer Größe von 30 kDa passiv diffundieren, findet ein Rezeptor vermittelter aktiver und Signal-abhängiger Transport von Proteinen und Ribonukleoprotein Komplexen statt (Feldherr & Akin, 1997; Keminer *et al.*, 1999). Die Kernporen-Komplexe besitzen ein Molekulargewicht von etwa 66 MDa in Hefe (Stoffler *et al.*, 2003) und 125 MDa in Wirbeltierzellen (Fabre & Hurt, 1997; Cronshaw *et al.*, 2002). Auf der Ebene der Kernmembran bilden die Kernporen-Komplexe ein oktagonal symmetrisches Zentralelement, das aus drei planaren Ringstrukturen besteht, die den Transportkanal umschließen (Abb. 1). Diese sind über Speichen miteinander verbunden (Speichenkomplex). Zwei charakteristische planare Ringeinheiten sind zum einen der zytoplasmatische und der nukleäre Ring, von denen acht

periphere Filamente ausgehen. Die nukleären Filamente vereinigen sich am distalen Ende zu einem nukleären Ring, um den nukleären Korb („nuclear basket“) zu bilden, während die von dem zytoplasmatischen Ring ausgehenden acht Filamente ungleichmäßig geformt erscheinen und in das Zytoplasma ragen, wo sie mit dem Fibrillen des Zytoskeletts verbunden sind (Galy *et al.*, 2000; Kosova *et al.*, 2000; Kiselva *et al.*, 2004; Fahrenkrog *et al.*, 2001) (Abb. 1). Makromoleküle werden nach derzeitigen Annahmen für den Importprozess über die Zytoskelettfibrillen und zytoplasmatischen Fibrillen des Kernporen-Komplexes eingefangen (Pante & Aebi, 1996; Görlich & Mattaj, 1996; Rutherford *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu steht die Korbstruktur im Zusammenhang mit dem nukleären Export. Das Zentralelement bildet einen Sanduhrförmigen Tunnel mit einem Durchmesser von 40 nm an seiner engsten Stelle im aktiven Transportzustand (Peters, 2005; Roderick *et al.*, 2008). Sowohl die Wirbeltier als auch die Hefe Kernporen-Komplexe setzen sich aus rund 30 verschiedenen Proteinen, den sog. Nukleoporinen zusammen, die in 8,16 oder 32 Kopien vorliegen (Cronshaw *et al.*, 2002) und die supramolekulare Größe erklären. In der Mehrheit sind die peripheren Nukleoporine sowohl auf der zytoplasmatischen als auch auf der nukleären Seite symmetrisch verteilt. Einige Nukleoporine befinden sich jedoch ausschließlich auf der nukleären (z.B. Nup1p, Nup2p, Nup60p) oder zytoplasmatischen (z.B. Nup159p, Nup358p) Seite des Kernporen-Komplexes und tragen somit zu einer Asymmetrie und Direktionalität von Transportvorgängen bei (Bednenko *et al.*, 2003b; Cronshaw *et al.*, 2002; Fahrenkrog *et al.*, 1998; Rout *et al.*, 2000; Denning *et al.*, 2001; Dilworth *et al.*, 2001). Etwa ein Drittel der Nukleoporine zeichnen sich durch repetitive FG, FXFG oder GLFG Aminosäuren-Sequenzmotive aus. Über diese erfolgt die Interaktion der Kernporen-Komplexe mit den Transportrezeptoren, die den direktionalen und signalabhängigen Transport zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma regeln (Görlich & Kutay, 1999; Fried & Kutay, 2003; Conti & Izaurralde, 2001; Peters, 2005). Die FG-reichen Nukleoporine sind so positioniert, dass sie für die zu transportierende Fracht mit ihren assoziierten Rezeptoren gut zugänglich sind. Die Transportrezeptoren weisen nicht nur eine zum Transportsubstrat spezifische Affinität auf, sondern ermöglichen über die Bindung der FG-reichen Interaktionsstellen der Nukleoporine eine rasche Passage durch den Transportkanal (Ribbeck & Görlich, 2001). Ein effektiver mRNA Export wird u.a. auch von dem Protein Mlp1p (hTpr in *Mammalia*) unterstützt, welches über eine Interaktion mit dem Nukleoporin Nup60p auf der kernplasmatischen Seite mit dem Kernporen-Komplex verankert ist. Mlp1p fungiert in der Erkennung von korrekt prozessierten mRNAs, die dann an den Kernporen-Komplexen konzentriert und für den Exportprozess kanalisiert werden (Fasken & Corbett, 2009).

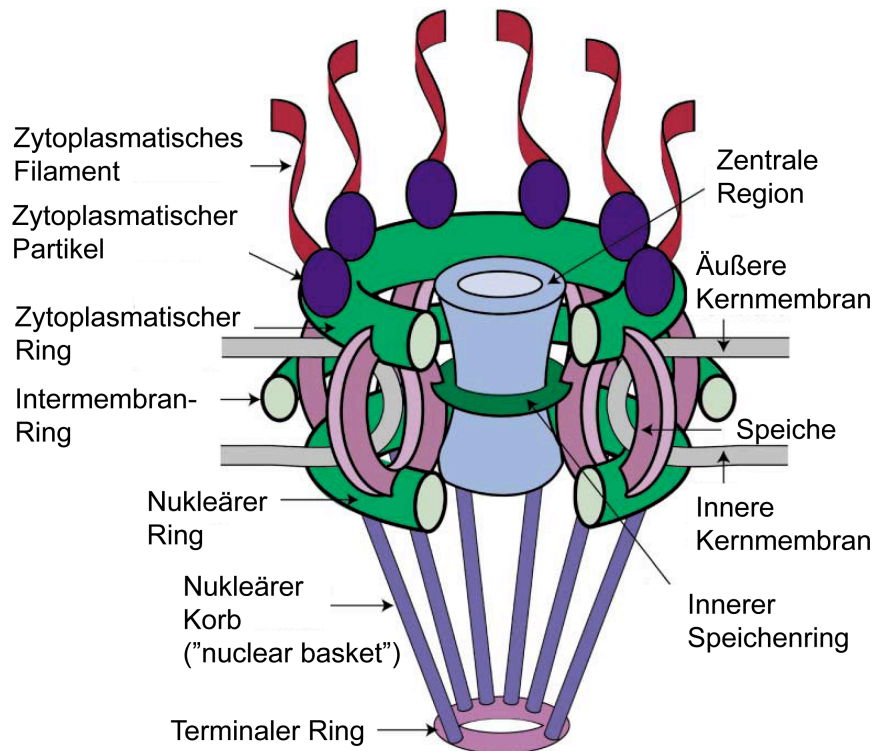


Abb. 1: Modell des Kernporen-Komplexes. Das oktagonale Zentralelement besteht aus mehreren planaren Ringen, die über Speichen miteinander verbunden sind. Von einem zytoplasmatischen Ring entspringen zytoplasmatische Filamente, während von dem nukleären Ring nukleäre Filamente ausgehen, die sich am distalen Ende zu einem terminalen Ring vereinigen und den sog. nukleären Korb bilden (nach Suntharalingam & Went, 2003).

1.4 Der Kernporentransport

Ionen und kleinere Proteine passieren die Kernporen-Komplexe frei durch Diffusion. Größere Moleküle werden über einen aktiven Transportmechanismus in den Zellkern befördert. Der Transport dieser Proteine wird überwiegend von einer Rezeptorenfamilie vermittelt, die als Karyopherine (Kap) bekannt sind. Die Funktion und Struktur der meisten Karyopherine ist konserviert von der Hefe bis zum humanen Organismus. In Hefe existieren 14 und in höheren Eukaryonten 22 Karyopherine (Strom & Weis, 2001). Allen Karyopherinen sind charakteristische helikale HEAT-Domänen eigen, die die Basis für Protein-Protein-Wechselwirkungen schaffen. Darüberhinaus enthalten sie eine unkonservierte carboxyterminale Domäne, über die sie hochspezifisch ihr Substrat erkennen und binden. Je nach ihrer Transportrichtung erfolgt die weitere Namen gebende Unterscheidung von Importinen und Exportinen. So binden die Importine, die für den Import vorgesehenen Substrate über die Erkennung von nukleären Lokalisationssignalen („nuclear localization signal“ = NLS). Umgekehrt markieren nukleäre Exportsignale („nuclear export signal“ = NES) der Substrate die Exportrichtung. Die NLS Erkennungssequenzen zeichnen sich durch einen

hohen Gehalt an basischen Aminosäuren aus, während die NES-Sequenzen durch eine Vielzahl hydrophober Aminosäuren gekennzeichnet sind (Rout *et al.*, 2000; Kosugi *et al.*, 2008). Einige redundante Transportsignale wie sie beispielsweise für einige ribosomale Proteine gefunden wurden, ermöglichen nicht nur die Assoziation eines einzelnen Karyopherins, sondern die Bindung verschiedener Karyopherine (Strom & Weis, 2001; Fried & Kutay, 2003). Die Karyopherine binden an ihr Substrat direkt oder aber kontaktieren diese über Adapterproteine. In ihrer Rezeptorfunktion interagieren sie während des Translokationsprozesses gleichzeitig mit ihrem zu transportierenden Substrat und mit den Nukleoporinen der Kernporen-Komplexe. Der Zyklus aus Kompartiment spezifischer Substratbindung und Substratfreisetzung wird von der hochkonservierten GTPase Ran („Ras related nuclear protein“) vermittelt. Ran wechselt zwischen einer GTP und GDP gebundenen Form und wirkt als molekularer Schalter durch seine asymmetrische Verteilung im Zellkern und Zytoplasma. Ran-GTP ist aufgrund der nukleären Präsenz des Ran GEF („Ran guanine nucleotide exchange factor“) im Zellkern stark angereichert. Dieser Gradient unterstützt die Substrataffinität und Direktionalität der Karyopherine, die diese über eine Ran-GTP Bindedomäne detektieren und binden. Die Exportine binden Ran-GTP und verlassen den Zellkern mit ihrem Substrat im Ran-GTP gebundenen Zustand (Abb. 2). Im Zytoplasma erfolgt über die GTP-Hydrolyse die Freisetzung des Transportsubstrates. Der Rücktransport der Exportine erfolgt im ungebundenen Zustand selbsttätig (Abb. 2). Die Importrezeptoren gelangen im Ran-GDP gebundenen Zustand mit ihrem Import-Substrat in den Zellkern. Dort stimuliert Ran-GTP wiederum die Freisetzung des Substrates von den Importinen und unterstützt umgekehrt die für den Export bestimmte Substratbindung durch Exportine (Mattaj & Englmeier, 1998; Görlich & Kutay, 1999; Macara, 2001) (Abb. 2). Die Aufrechterhaltung des Gradienten wird wiederum über eine entsprechende asymmetrische Verteilung von Regulatoren erzeugt. Das ausschließlich im Zytoplasma vorkommende Rna1p (RanGAP („Ran specific GTPase activating protein in höheren Eukaryonten) und die entsprechenden Bindeproteine Yrb1p und Yrb2p (Ran Bindeproteine 1 und 2 (RanBP1 und RanBP2) in höheren Eukaryonten)) arbeiten zusammen, um die GTP-Hydrolyse zu stimulieren (Butler G & Wolfe KH, 1994). Yrb1p (RanBP1) und Yrb2p (RanBP2) entfernen zuerst das Ran-GTP vom Import-Rezeptor und unterstützen die RanGAP abhängige Hydrolyse des an Ran gebundenen GTP zu GDP. Um einer zytoplasmatischen Akkumulation von Ran-GDP entgegenzuwirken, wird dieses von dem stark spezialisierten Transportrezeptor NTF2 („nuclear transport factor“) reimportiert, der keine Homologie zu den Karyopherinen aufweist (Smith *et al.*, 1998). Auf der nukleären Seite katalysiert das Chromatin assoziierte Rcc1p/Prp20p („Ran-specific guanine nucleotide exchange factor“ (Ran-GEF) in höheren Eukaryonten) den Austausch von Ran-GDP zu Ran-GTP (Mattaj & Englmeier, 1998; Görlich

& Kutay, 1999; Kaffman & O'Shea, 1999; Conti & Izaurralde, 2001; Kunzler & Hurt, 2001; Bischoff *et al.*, 2002) (Abb. 2).

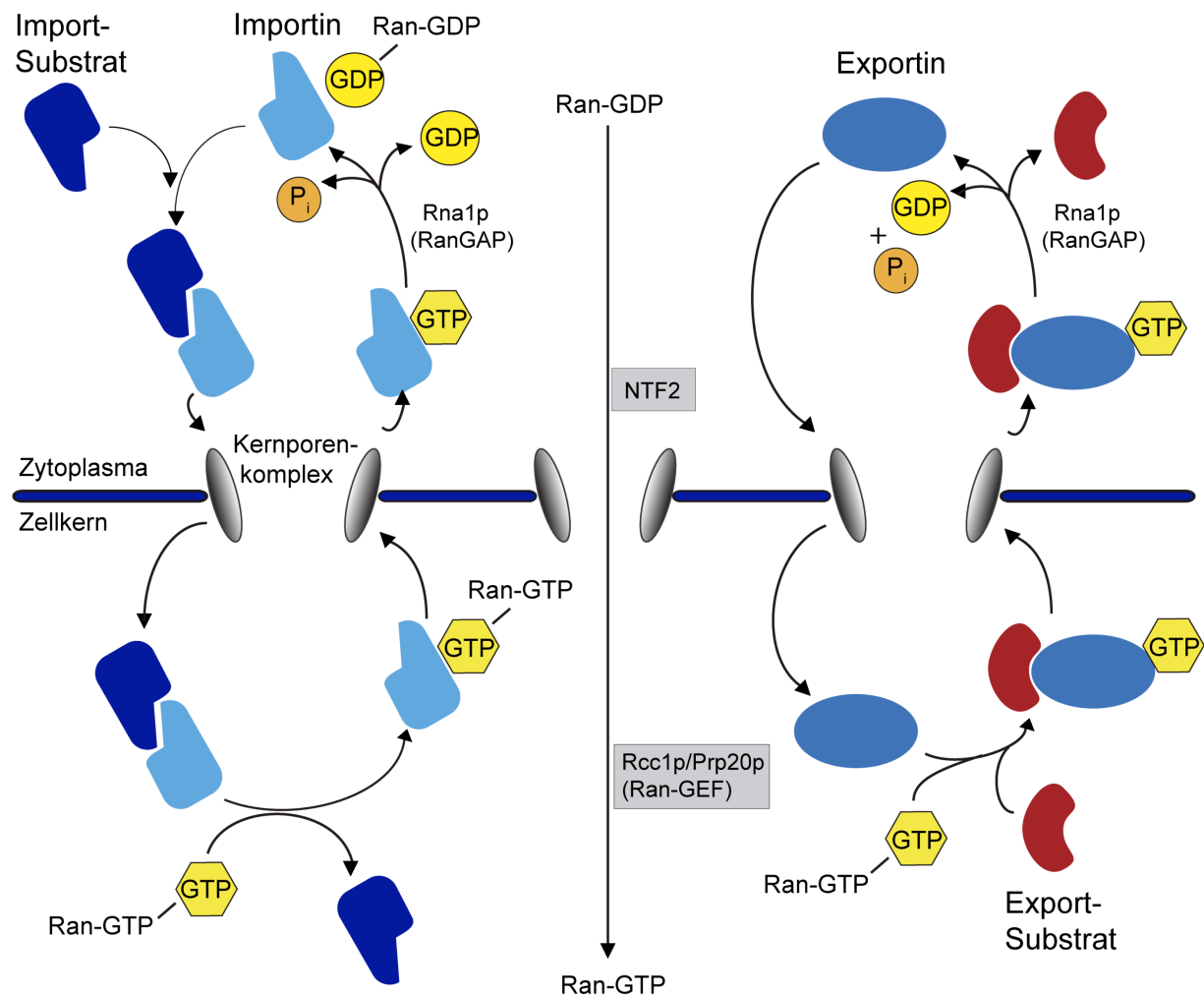


Abb. 2: Schematische Darstellung der Karyopherin-vermittelten Import- und Exportprozesse und ihrer Regulation durch das RanGTPase-System nach Ström & Weis, 2001. Im Zytoplasma assoziiert das Importsubstrat mit seinem Importin und wird über diesen Rezeptor in den Zellkern transportiert. Durch die Bindung von Ran-GTP an das Importin, wird das Substrat freigesetzt und der Importrezeptor im Ran-GTP gebundenen Zustand zurück transportiert. Dort wird über die Wirkungsweise von Yrb1p (RanBP1), Yrb2p (RanBP2) und Rna1p (RanGAP) die Hydrolyse von Ran-GTP zu Ran-GDP stimuliert. Im Exportprozess bindet der Exportrezeptor im Ran-GTP gebundenen Zustand sein Substrat und transportiert dieses in das Zytoplasma. Über die Hydrolyse von Ran-GTP zu Ran-GDP wird das Exportsubstrat freigesetzt. Um den stetigen Austritt von RanGTP auszugleichen, wird das gebildete RanGDP über den Rezeptor NTF2 importiert. Auf der nukleären Seite katalysiert Rcc1p/Prp20p (Ran-GEF) den Austausch von Ran-GDP zu Ran-GTP. Pi: anorganisches Phosphat

1.5 Der Karyopherin vermittelte Kerntransport

Beispiele für einen Karyopherin vermittelten Importprozess liefern die zur Importin β Familie gehörenden Importine Kap123p/Yrb4p und Kap95p (Importin β in höheren Eukaryonten)

(Rout *et al.*, 1997; Chi *et al.*, 1995; Enenkel *et al.*, 1995). Kap123p/Yrb4p bindet einige seiner Substrate, z.B. ribosomale Proteine, die für die nukleolare Assemblierung der präribosomalen Untereinheiten importiert werden müssen, direkt (Jäkel & Görlich, 1998; Palmeri & Malim, 1999; Truant & Cullen, 1999). Kap95p erkennt neben einer direkten Substratbindung, eine Anzahl an weiteren Proteinen, die die beschriebenen klassischen Kernlokalisierungssignale aufweisen über eine Bindedomäne (IBB) seines Adapterproteins Srp1p/Kap60p (Importin α in höheren Eukaryonten) (Görlich *et al.*, 1995; Moroianu *et al.*, 1995). Mit Hilfe des in höheren Eukaryonten bekannten Importin β Adapterproteins Snurportin 1 erfolgt hingegen spezifisch der Import von im Zytoplasma prozessierten spleißosomalen U snRNP Partikeln („uracil-rich small nucleoprotein particles“) (Huber *et al.*, 1998). Das Karyopherin Kap104p und sein Homolog Transportin in den höheren Eukaryonten sind für den Import einer Reihe von mRNA Bindeproteinen verantwortlich. Transportin bindet seine bekanntesten Substrate hnRNP A1 und hnRNP K („heterogeneous nuclear RNP“) nicht über die klassischen NLS-Sequenzen. Statt dessen weisen diese Substrate eine Glyzin-reiche, M9 benannte Peptidsequenz auf, die für die Importin Erkennung bedeutsam ist (Michael *et al.*, 1995; Siomi & Dreyfuss, 1995; Weighart *et al.*, 1995). In *S. cerevisiae* importiert Kap104p die mRNA Bindeproteine Hrp1p („hnRNP-like protein“) und Nab2p („nuclear abundant poly(A) RNA binding protein“) (Aitchison *et al.*, 1996; Lee & Aitchison, 1999). Das Importin Mtr10p ist für den Transport der SR-ähnlichen mRNA Bindeproteine Npl3p, Gbp2p und Hrb1p in *S. cerevisiae* zuständig (Senger *et al.*, 1998, Windgassen & Krebber, 2003, Häcker & Krebber, 2004. Transportin-SR bindet analog die SR-reichen Domänen der SR-Proteine in höheren Eukaryonten. Ein bekanntes Beispiel für ein Karyopherin, das den Export von Proteinen gewährleistet, ist das Xpo1p/Crm1p/Kap124p in *S. cerevisiae* und sein homologer Partner Crm1/Xpo1 in höheren Eukaryonten. Diese Karyopherin verfügt in seiner Exportfunktion über ein breites Substratspektrum, welches unter zur Hilfenahme von Adaptoren unterstützt wird. Xpo1p (Crm1/Xpo1) ist beispielsweise bekannt als Exportrezeptor für den Transport der präribosomalen Untereinheiten (1.6) und dem Export von U snRNAs (Fornerod *et al.*, 1997; Paraskeva *et al.*, 1999; Ohno *et al.*, 2000; Grosshans *et al.*, 2001; Thomas & Kutay, 2003).

1.6 Die Ribosomen-Biogenese und der nukleärer Export der prä-ribosomalen Untereinheiten

Strukturelle und funktionelle Grundprinzipien der Ribosomen sind innerhalb verschiedener Organismen Gruppen hochkonserviert. In höheren Eukaryonten bestehen die Ribosomen zu etwa zwei Drittel aus rRNAs und zu einem Drittel aus ribosomalen Proteinen. Sie fügen sich

aus den zwei ribosomalen Untereinheiten 40S und 60S zum funktionalen 80S Ribosom im Zytoplasma zusammen. In *S. cerevisiae* besteht die große 60S Untereinheit aus ca. 46 ribosomalen Proteinen und den drei rRNA-Spezies 5S, 5.8S und 25S rRNA, während die kleine ribosomale 40S Untereinheit aus 32 ribosomalen Proteinen und der kleinen 18S rRNA aufgebaut ist. Die eukaryontische Ribosomenbiogenese erfolgt unter einer Vielzahl von nukleären (und nukleolaren) Import- und Exportprozessen. In *Saccharomyces* werden pro Minute und pro Kernporen-Komplex ca. 25 präribosomale Untereinheiten exportiert und ca. 1000 ribosomale Proteine importiert (Warner, 1999). Eine Vielzahl von nicht ribosomalen Proteinen (u.a. Endo- und Exonukleasen, Pseudouridin-Synthasen, Methyltransferasen und RNA-Helikasen) unterstützen die Ribosomenbiogenese (Kressler *et al.*, 1999; Venema & Tollervey, 1999; Zemp & Kutay, 2007). Zu Beginn erfolgt die nukleolare rDNA Transkription zur 35S-rRNA durch die RNA-Polymerase I und der 5S-rRNA Synthese durch die RNA-Polymerase III. An das 35S rRNA Primärtranskript assoziieren ribosomale Proteine, die zusammen mit weiteren, nicht ribosomalen Proteinen sowie snoRNAs („small nucleolar RNAs“) ein ribosomales 90S Vorläuferpartikel bilden (prä-90S Ribosoms). Es wird angenommen, dass in diesen Strukturen bereits parallel zur noch laufenden rRNA Transkription die ersten Schritte der Prozessierung ablaufen (Dragon *et al.*, 2002; Osheim *et al.*, 2004; Fernandez *et al.*, 2007; Milkereit *et al.*, 2001). Das 35S-Transkript enthält die drei rRNA Spezies 18S, 5,8S und 25S rRNA, die durch zwei interne transkribierte Bereiche (ITS1 und ITS2) voneinander getrennt und am 5'- und 3'-Ende von den externen transkribierten Bereichen (5'-ETS und 3'-ETS) flankiert werden (De la Cruz *et al.*, 2005). Im Zuge der Prozessierung des prä-90S Ribosoms im Nukleolus erfolgen die zwei endonukleolytischen Spaltungen der 35S rRNA, die eine 27S und 20S rRNA generieren und durch diese Spaltung auch die Bildung der dann separierten ribosomalen prä-60S und 40S Untereinheiten einleiten. Die 40S Untereinheit wird relativ zügig in das Zellkernplasma und Zytoplasma transportiert. Die transportierenden Faktoren, die den Transportweg der ribosomalen 40S Untereinheit vom Nukleolus in das Zellkernplasma bestimmen, sind noch nicht identifiziert worden. Der nukleäre Export in das Zytoplasma wird von dem hochkonservierten Exportin Xpo1p gewährleistet (Abb. 3). Ein Adapterprotein, das eine NES-Sequenz trägt und den Transport der präribosomalen 40S Untereinheit gewährleistet, ist bislang noch nicht bekannt (Schäfer *et al.*, 2003). Im Zytoplasma angekommen, erfolgt eine weitere 3' End Spaltung und Dimethylierung der 20S rRNA, ein Prozess der in *Saccharomyces* von den Faktoren Nob1p, Rrp10p/Rio1p, Rio2p und Dim1p katalysiert wird und die reife 40S Untereinheit generiert (Schäfer *et al.*, 2003; Fatica *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu erfolgen weitere Prozessierungen der prä-60S Untereinheit im Nukleolus und Zellkernplasma, in denen die Spaltung und weitere Prozessierung der 27S rRNA zur 25S und 5,8S rRNA erfolgen. Schließlich benötigt die prä-60S Untereinheit für ihre Prozessierung und den intranukleären

Transport Rsa4p, Noc1p, Noc2p, Noc3p, Nog1p, Nog2p/Nug2p sowie einige Rixp-Proteine (Milkereit *et al.*, 2001; De la Cruz *et al.*, 2005; Nissan *et al.*, 2002; Milkereit *et al.*, 2003b; Johnson *et al.*, 2002). Für den nukleären Export der präribosomalen großen Untereinheit assoziiert Nmd3p (Nmd3 in *Mammalia*) als Adapterprotein, welches eine NES-Sequenz für den Transport der ribosomalen prä-60S Untereinheit trägt (Ho *et al.*, 2000; Gadai *et al.*, 2001b; Johnson *et al.*, 2002; Thomas & Kutay, 2003; Trotta *et al.*, 2003). Das Leuzin-reiche NES Signal von Nmd3p wird von dem Export Rezeptor Xpo1p erkannt (Ho *et al.*, 2000; Gadai *et al.*, 2001b) (Abb. 3). Ein weiterer parallel agierender Export-Rezeptor für den Transport der prä-60S Untereinheit ist das Heterodimer Mex67p-Mtr2p, welches auch im Exportprozess der mRNAs eine bedeutende Rolle spielt. (Yao *et al.*, 2007) (1.7.5). Ein drittes jedoch nicht essentielles Export-Rezeptorprotein ist Arx1p (Kressler *et al.*, 2010; Lebreton *et al.*, 2006; Hung *et al.*, 2008), das zusammen mit dem ebenfalls nicht essentiellen Alb1p als Heterodimer in diesem Prozess agiert (Lebreton *et al.*, 2006; Abb. 3). TAP-p15, die humanen Orthologe zu Mex67p-Mtr2p und Ebp1, das humane Ortholog zu Arx1p, sind hingegen nicht im Ribosomentransport involviert (Bradatsch *et al.*, 2007; Yao *et al.*, 2007). Im Zytoplasma dissoziieren die Transportfaktoren, während das in Eukaryonten konservierte Protein Rpl10p assoziiert, um das reife ribosomale 60S Partikel zu bilden (Kohler & Hurt, 2007). Die Rpl10p Bindung wird unterstützt durch sein „Chaperon“ Sgt1p/Qsr1p in Anwesenheit des Lsg1p im GTP gebundenen Zustand. Die von der GTPase Lsg1p mediatisierte GTP Hydrolyse fördert eine Konformationsänderung der 60S Untereinheit, die die Rpl10p Bindung verstärkt und gleichzeitig die Dissoziation von Nmd3p und Sgt1p zur Folge hat (Abb. 3). Die 60S Untereinheit wird somit für das „Subunit joining“ (Zusammenführung der beiden ribosomalen Untereinheiten zum Monosom) vorbereitet (Hedges *et al.*, 2005, West *et al.*, 2005; Eisinger *et al.*, 1997). Die exportierte 40S Untereinheit bindet hingegen zunächst einen ternären Komplex bestehend aus dem Translations-Initiationsfaktor 2 (eIF2/YGR054W) und GTP sowie der Methionyl-Transfer RNA (Met-tRNA_i^{Met}). Die Assoziation weiterer Initiationsfaktoren wie eIF3, eIF1A und eIF5 generieren schließlich den 43S Präinitiationskomplex. Ein Proteinkomplex, der aus den Faktoren eIF4E/Tif45p, eIF4G/Tif4632p und eIF4A/Tif1p besteht, bindet die Kappenstruktur des 5'-Endes der mRNA. eIF4G/Tif4632p verbindet sich darüberhinaus mit dem Poly(A) Bindeprotein Pab1p (PABP in höheren Eukaryonten) und führt so über die Verbindung von 5'- und 3'-Ende zu einer Zirkularisierung der mRNA. Diese Zirkularisierung der mRNA und die ATP-abhängige Helikase-Aktivität von eIF4A/Tif1p unterstützen die Verbindung von der mRNA mit dem 43S Präinitiationskomplex, der damit zum 48S Präinitiationskomplex wird. Dieser Komplex scannt die mRNA nach dem AUG Startkodon in einer ATP abhängigen Reaktion. Schließlich stimuliert der 48S assoziierte Initiationsfaktor eIF5B/Fun12p die Stabilisierung der Met-tRNA Bindung und kontrolliert das „Subunit joining“ von 48S und 60S Untereinheit in einer GTP

abhängigen Weise (Abb. 3). Mit der GTP Hydrolyse und der Dissoziation von eIF5B/Fun12p wird die 80S Monosomenbildung vollzogen und führt damit zu der Entstehung des Translation kompetenten Ribosoms (Pestova *et al.*, 2000; Shin & Dever; Searfoss *et al.*, 2001).

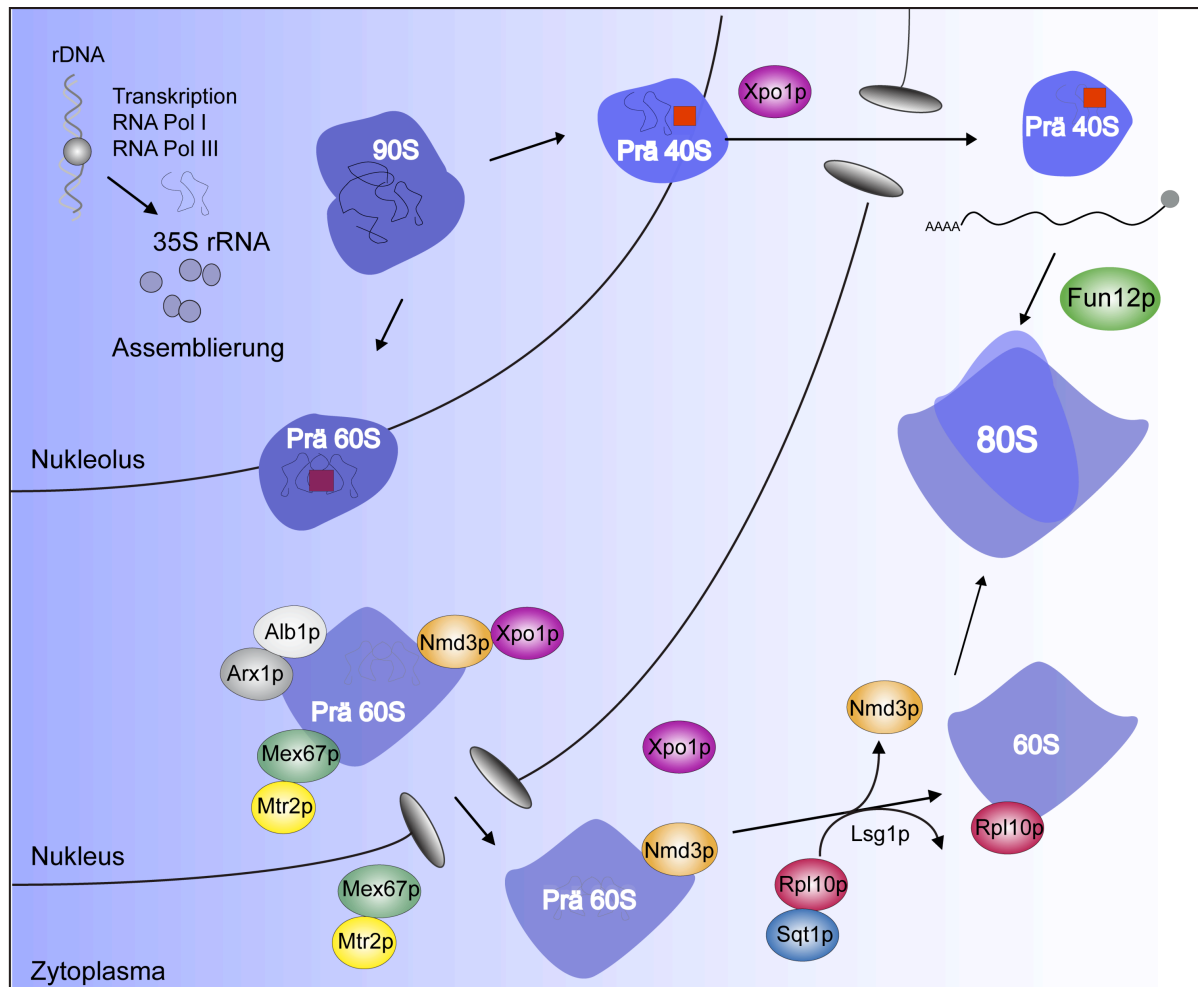


Abb. 3: Schematische Darstellung der Ribosomen-Biogenese und des Exports präribosomaler Untereinheiten. Die Ribosomen-Biogenese beginnt im Nukleolus mit der 35S rRNA Synthese. Die importierten ribosomalen Proteine und die 35S rRNA assoziieren im Nukleolus zu einem Prä-90S Ribosom. Nach extensiven Modifizierungsschritten erfolgt die Spaltung in die ribosomalen 40S und Prä-60S Vorläuferstrukturen, die in das Zellkernplasma gelangen und nach weiteren Prozessierungen über die in der Abbildung benannten Export-Adapter und Rezeptoren in das Zytoplasma gelangen. Dort erfolgt nach weiteren Prozessierungen und Assoziationen die Fusion der beiden Untereinheiten zu einem funktionsfähigen 80S Monosom.

1.7 mRNA Prozessierung und Transport

Karyopherine und das mit ihnen verknüpfte Ran-GTPase System sind in erster Linie nicht am Export der mRNA beteiligt (Neville & Rosbash, 1999; Clouse *et al.*, 2001). Hierfür sind

andere Exportfaktoren verantwortlich, die im folgenden näher beschrieben werden. Zunächst soll jedoch die Entstehung der Export kompetenten mRNA näher beleuchtet und damit die Abfolge der einzelnen Prozessierungsschritte erläutert werden.

1.7.1 mRNA Biogenese und Prozessierung von mRNA

Im Zellkern erfolgt die RNA-Polymerase II vermittelte DNA Transkription zur sog. heterogenen nukleären (hn) RNA auch prä-mRNA genannt. Der Transkriptionsprozess ist eng vernetzt mit den mRNA Prozessierungsschritten und der schließlichen Assemblierung zu einem Export kompetenten Ribonukleoprotein-Komplex (mRNP). Zu den Prozessierungsprozessen gehören die 5'-Monomethylguanosin-Kappenstrukturbildung, das Intron-Spleißen und die 3'-Endprozessierung/Polyadenylierung. Diese Prozesse sowie die akkurate Assemblierung der mRNA zu einem mRNP Komplex finden unter der Assoziation einer Vielzahl von Proteinen statt, die transient oder stabil bis zur Translationsphase gebunden bleiben können.

1.7.2 5'-Kappenstruktur

Kurz nach der Transkriptionsinitiation, etwa 20-30 Nukleotide (nt) nach dem Synthesestart, erfolgt die Bildung einer Kappenstruktur am 5'-Ende in der initialen kovalenten Bindung eines 7-Methyl-Guanosin, welche als schützende Nukleotidmodifikation vor dem Abbau neutranskribierter RNA durch 5'-3' Exonukleasen dient (Coppola *et al.*, 1983; Salditt-Georgieff *et al.*, 1980; Rasmussen & Lis, 1993). Die Kappenstruktur dient nicht nur dem Schutz vor Abbau, sondern vermittelt auch einen effektiven Transport reifer mRNAs durch die Kernporen-Komplexe (Lewis & Izaurralde, 1997). Das 5' „Cap“ wird von den beiden Proteinen Cbp20p und Cbp80p erkannt und bildet den sog. „Cap binding complex“ (CBC); Görlich *et al.*, 1996; Visa *et al.*, 1996). Der CBC-Komplex unterstützt den Spleißingprozess über eine direkte Interaktion mit den frühen Spleißingfaktoren und stimuliert sowohl die Erkennung als auch die Spaltung der „Cap“ nahen 5' Spleißseite in höheren Eukaryonten (Colot *et al.*, 1996; Lewis *et al.*, 1997; Flaherty *et al.*, 1997).

1.7.3 Prä-mRNA Spleißing

Ein weiterer Prozessierungsvorgang ist das nukleäre prä-mRNA Spleißen. Nicht kodierende Bereiche, sog. Introns, innerhalb der kodierenden Sequenz müssen vor dem Transport in das Zytoplasma entfernt und die kodierenden Bereiche (Exons) zu einem kontinuierlichen Transkript ligiert werden. Im Gegensatz zu den vielzelligen Organismen, deren Gene zu 95% Intronsequenzen aufweisen, sind in dem Hefeorganismus *S. cerevisiae* nur 5% der Gene mit einem Intron ausgestattet. Im humanen Organismus weisen die Transkripte zudem im Schnitt 3,7 Intron-Bereiche auf, während in *S. cerevisiae* bis auf wenige Ausnahmen nur ein Intron in ihrer prä-mRNA Sequenz vorhanden ist (Ares *et al.*, 1999). Diese werden in der Regel über die konservierten Konsensus-Motive im konstitutiven Spleißingprozess herausgeschnitten (gespleißt) (Ast, 2004; Balakrishnan *et al.*, 2005; Juneau *et al.*, 2006; Davis *et al.*, 2000). Die funktionelle Hauptgruppe Intron-haltiger Gene bildet die Gruppe der ribosomalen Protein Gene (RPG), die hoch exprimiert in der Zelle erscheinen und einen Transkriptanteil von 25%-30% des Gesamt-„Pools“ einnehmen (Ares *et al.*, 1999; Lopez & Seraphin, 1999). Das Spleißen wird durch das makromolekulare Spleißosom katalysiert (1.7.3.2). Die Bereiche der Primärtranskripte, an denen das Spleißing vollzogen wird, muß exakt erkannt werden. Die fehlerhafte Erkennung eines einzigen Nukleotids führt bereits zu einem Leserasterschub und kann zu der Translation nicht funktionsfähiger Proteine führen, die toxisch für die Zelle sein können und auch als Ursache für eine Vielzahl von Erkrankungen wie z.B. Krebs oder neurodegenerativen Erkrankungen beschrieben wurden (Ares *et al.*, 2000; Stoilov *et al.*, 2002; Le Fur *et al.*, 1979, Stickeler *et al.*, 1999, Wang & Cooper, 2007). Die Exon-Intron Übergänge der 5' und 3' Spleißstellen („splice site“, SS) zeichnen sich durch eine Konsensus Sequenz bestehend aus 2-7 Nukleotiden aus. Die 5' Spleißstelle besteht aus den Dinukleotiden GU und die 3' Spleißstelle am Ende des Introns setzt sich aus dem Dinukleotid AG zusammen, welche häufig durch eine Polypyrimidin-reiche Sequenz (Polypyrimidin-Trakt) flankiert werden. Diese regulatorisch wirksamen DNA Abschnitte (*cis*-Elemente) sind hoch konserviert (Abb. 4). In höheren Organismen erfolgt zu einem Großteil (76%) das Spleißen von alternativen Spleißstellen, die von den konservierten Sequenzmotiven abweichen (Black *et al.*, 2003; Stamm *et al.*, 2004). Diese alternativ gespleißten nicht konservierten DNA-Abschnitte generieren variable Transkripte, die zur Expression von Proteinisoformen in entsprechenden Zellgeweben, Entwicklungsstadien oder als Antwort auf externe Signale entstehen (Black, 2003; Faustino & Cooper, 2003). Alternatives Spleißen kann auch die Funktion der Proteine verändern, indem z.B. spezifische Domänen wie NLS, Transkriptionsaktivierungsdomänen, DNA oder RNA Bindedomänen entweder vorhanden oder durch eine Intron Exzision abwesend sind (Davletov & Jimenez, 2004). Die Gruppe der SR-Proteine und andere mRNA Bindeproteine (z.B. hnRNP A1) der höheren Eukaryonten regulieren die Selektivität dieser alternativen Spleißstellen durch

direkte Bindung von sog. „exonic splicing enhancer“ (ESE)-Sequenzelementen, die die Spleißstellen flankieren.

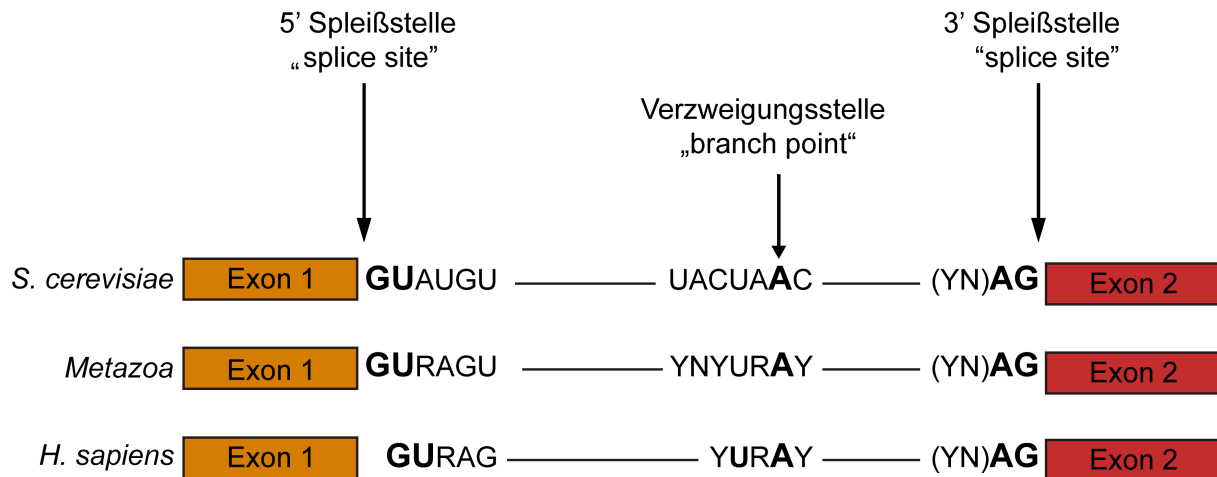


Abb. 4: Vergleichende Sequenzanalyse intronischer Konsensusmotive in *S. cerevisiae*, *Metazoa* und *H. sapiens*. Die Konsensusmotive an der 5' und 3' Spleißstelle sowie am Verzweigungspunkt sind dargestellt. Hochkonservierte Nukleotide (>90%) sind besonders hervorgehoben, R steht für Purine, Y für Pyrimidine und N für ein beliebiges Nukleotid (Wahl *et al.*, 2009).

1.7.3.1 Die Spleißing-Reaktion

Die Spleißing-Reaktion wird in zwei aufeinanderfolgenden Transesterifizierungsreaktionen katalysiert. Wie in Abbildung 5 gezeigt, erfolgt in einem ersten Schritt der nukleophile Angriff der 2'-OH Gruppe der Ribose des konservierten Adenosins in der Verzweigungsstelle auf die Phosphatgruppe der 5'-Spleißstelle. Dies führt zu der Ausbildung einer freien 3' terminalen OH-Gruppe des Exons 1 und auf der anderen Seite zu der Zirkularisierung des Introns, welche aufgrund der Ausbildung einer Lasso-artigen Struktur auch als Lariat bezeichnet wird. Im zweiten Spleißing Schritt attackiert die frei gewordene 3'OH Gruppe des 5' Exons die Phosphatgruppe der 3' Spleißstelle. Diese zweite Transesterifizierungsreaktion führt zur Freisetzung des Introns und zur Ligation der beiden 5' und 3' Exone zu einem kontinuierlichen mRNA Transkript (Abb. 5; Arenas & Hurwitz, 1987; Moore *et al.*, 2006).

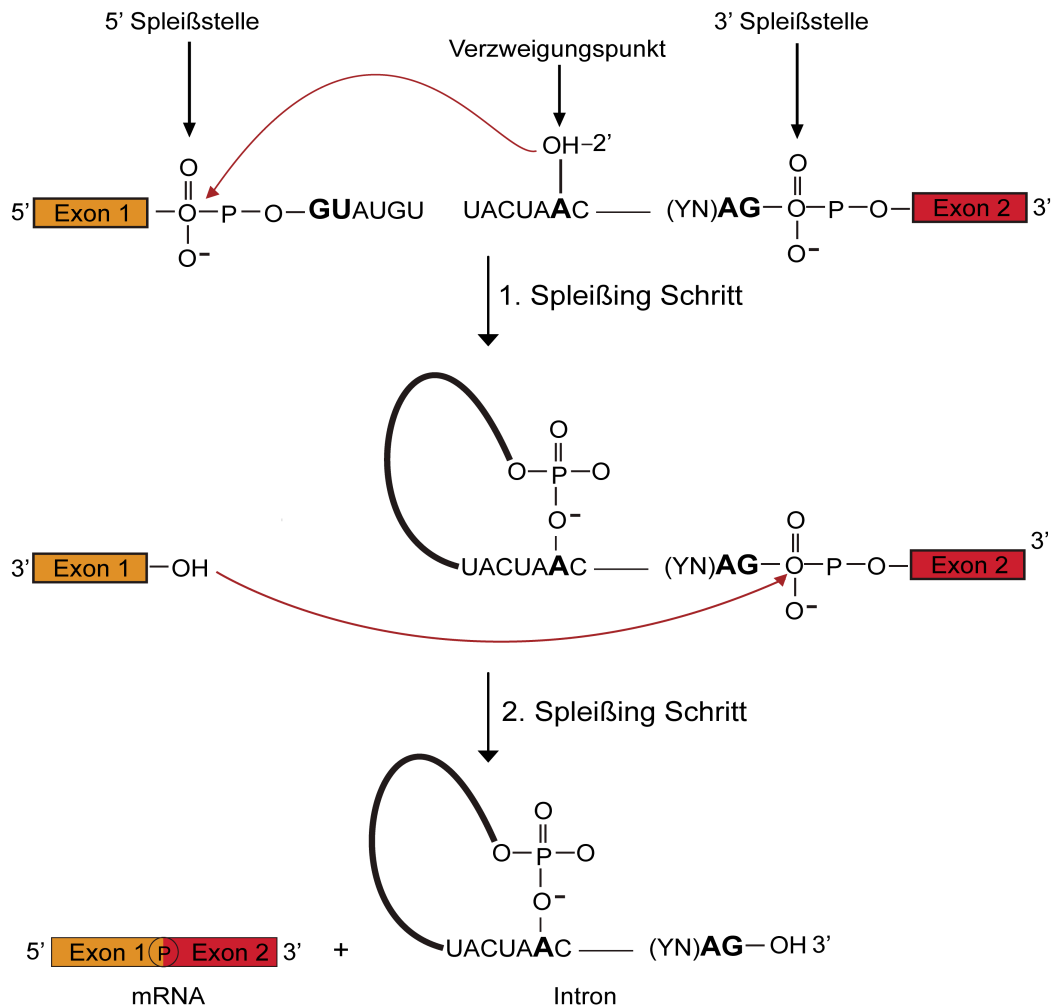


Abb. 5: Die Spleißing Reaktion. In zwei aufeinanderfolgenden Spleißing Reaktionen (Transesterifizierungen) erfolgt das Herausschneiden (Spleißen) der Intronsequenzen. Die Exonsequenzen verbinden sich zu einem kontinuierlich kodierenden mRNA Strang.

1.7.3.2 Die U snRNP Assemblierung zum funktionalen Spleißosom

Das Spleißosom setzt sich aus fünf U snRNPs (U1, U2, U5 und U4/U6 snRNPs, „uridine-rich small nuclear ribonucleoprotein particles“) und aus 80 anderen snRNP assoziierten Proteinen zusammen (Jurica & Moore, 2003). Ein U snRNP besteht aus einer kleinen nukleären RNA und aus sieben sm-Proteinen (Tan & Kunkel, 1966). Eine Ausnahme bildet der U6 snRNP Komplex, der sich aus sm ähnlichen („sm like“, Lsm) Lsm-Proteinen zusammensetzt (Mayes *et al.*, 1999). snRNA und Sm-Proteine assemblieren während der zytoplasmatischen Phase bevor sie an ihren Funktionsort im Zellkern zurücktransportiert werden.

Bevor eine erste Transesterifizierungsreaktion katalysiert werden kann, erfolgt die initiale spleißosomale Assemblierung des U1 snRNP über die ATP unabhängige Basenpaarung mit der 5' Spleißstelle (Abb. 6). Die Bindung wird durch die U1 snRNP Proteine und in höheren

Eukaryonten auch von der Gruppe der SR-Proteine stabilisiert. Bevor der U2 snRNP Komplex in einer ATP abhängigen Reaktion die Verzweigungsstelle des Introns bindet und fixiert, assoziieren die Proteine BBP/ScSF1p (SF1 in höheren Eukaryonten) und Mud2p (U2AF65 in höheren Eukaryonten). BBP bindet nicht nur die Verzweigungsstelle, sondern interagiert auch mit dem U1 snRNP Protein Prp40p (Rutz & Seraphin, 1999). Die bisher assemblierten Faktoren bilden den sog. E-Komplex („commitment complex“, CC). Die U2 snRNA verbindet sich über Basenpaarungen mit der Verzweigungsstelle der Intronsequenz in einer ATP abhängigen Reaktion (Wahl *et al.*, 2009). Das Adenosin der Verzweigungsstelle bleibt dabei für die Reaktion des nukleophilen Angriffs frei. Die Basenpaarungen werden von dem SF3a (Prp9p, Prp11p und Prp21p) und SF3b (Bud31p, Ysf3p und Rds3p) Spleißingfaktor Komplex unterstützt (Gozani *et al.*, 1996, Wahl *et al.*, 2009). Eine stabile Bindung des U2 snRNP erfordert das DEAD-Box Protein Prp5p, welches ebenfalls eine Intron überkreuzende Verbindung zwischen U1 und U2 snRNP herstellt (A Komplex) (Xu *et al.*, 2004; Moore *et al.*, 2006). In einem nachfolgenden Schritt findet die Assoziation des bereits nukleär assemblierten Tri snRNP (U4/U6, U5 snRNP), resultierend in der spleißosomalen B Komplex Bildung statt. Der Tri snRNP Komplex assoziiert vermutlich mit der 5' Spleißstelle des Exons. Auch wenn die Assemblierung mit den fünf U snRNPs komplett ist, bleibt das Spleißosom zunächst katalytisch inaktiv. Die Bildung des aktiven Spleißosoms erfordert starke Konformationsänderungen und kompositorische Neuankordnungen. Während dieser Umstrukturierungen kommt es zur Entwindung der U4/U6 snRNP Duplexe. Das U6 snRNP ersetzt das dissoziierende U1 snRNP an der 5' Spleißstelle und bildet Basenpaarungen mit dem U2 snRNP aus (Kandels-Lewis & Seraphin, 1993; Madhani & Guthrie, 1992; Konforti *et al.*, 1993; Sawa & Abelson, 1992). Die RNA Helikase Prp28p wurde identifiziert als Mediator für den Prozess des U1 Austausches gegen U6, der diesen durch eine Entwindungshilfe für die U1-5' SS Duplexformierung oder der U4/U6 snRNP Duplexe unterstützt. Die Interaktion von U2 und U6 snRNP bringt das Adenosin der Verzweigungsstelle in die räumlich Nähe der 5' Spleißstelle (Staley & Guthrie, 1999). Mit der Dissoziation von U1 und U4 snRNP (B* Komplex) und nach entsprechender Neuankordnung wird die erste Transesterifizierungsreaktion eingeleitet (Komplex C). Die Dissoziation des U4 snRNP setzt einen konservierten Sequenzbereich im U6 snRNP frei, der die U2/U6 Duplex snRNP Bildung ermöglicht und zum anderen eine Konformationsänderung („intramolecular stem loop“ (U6-ISL)) nach sich zieht. Die Dissoziation des U4 snRNP, die mit der Unterstützung von Prp8p vollzogen wird, ist für die Aktivierung des Spleißosoms essentiell (Kuhn *et al.*, 1999). Eine Reihe von weiteren Proteinen assoziieren wie z.B. der sog. Neunzehn Komplex („Nineteen complex“, (NTC)), der keine snRNA enthält und sich aus den Proteinen Prp19p, Ntc20p, Snt309p, Isy1p, Syf2p, Cwc2p, Prp46p, Clf1p, Cef1p zusammensetzt (Tarn *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2002).

Der Komplex stabilisiert die U5 und U6 snRNAs im aktivierten Spleißosom der ersten Spleißing-Reaktion. Der NTC-Komplex verläßt schließlich das Spleißosom zusammen mit der partiell gespleißten Intron-Lariat Struktur. Die Faktoren, die die erste Transesterifizierungsreaktion maßgeblich katalysieren, sind bislang noch nicht eindeutig identifiziert. Das nicht essentielle Protein Snu17p ist jedoch bekannt dafür, eine wichtige Rolle in der ersten Spleißing-Reaktion zu spielen (Gottschalk *et al.*, 2001). Das U5 snRNP ist essentiell für die zweite Spleißing Reaktion. Spleißosomale Konformationsneuanordnungen, die fähig sind, den ersten oder den zweiten Spleißing-Schritt zu katalysieren, konkurrieren miteinander (Zwei Phasen Modell). Das essentielle Prp8p (hPRP8/220K in humanen Organismen) besetzt eine zentrale Position im aktivierten Spleißosom. Es ist Bestandteil des U5 snRNP und interagiert direkt mit dem mRNA Substrat sowohl an der 5' SS als auch am Verzweigungspunkt sowie an der 3' SS. Prp8p unterstützt die Konformationsänderungen während des Umschaltens von Spleißing-Schritt I zu Spleißing-Schritt II (Umen & Guthrie, 1995; Grainger & Beggs, 2005). Im zweiten Spleißing-Schritt wird die Erkennung und das Spleißen der 3'-Spleißstelle neben Prp8p von den vier weiteren Spleißingfaktoren Prp16p, Prp17p, Prp18p und Slu7p in *S. cerevisiae* katalysiert. Alle diese Spleißing Schritt II Faktoren sind vom Hefe- bis zum humanen Organismus hoch konserviert (Ohno & Shimura, 1996; Horowitz & Krainer, 1997; Ben Yehuda *et al.*, 1998; Lindsey & Garcia-Blanco, 1998; Zhou & Reed, 1998; Chua & Reed, 1999a). Zunächst interagieren die RNA Helikase Prp16p und Prp17p in einer ATP-abhängigen Reaktion mit der 3' AG-Spleißstelle (Jones *et al.*, 1995). Nach einer ATP Hydrolyse führt eine Schwächung der Prp16p Bindung zu einer starken 3' SS Bindung von Slu7p und Prp8p, die von den Faktoren Prp17p und Prp18p maßgeblich unterstützt wird (Umen & Guthrie, 1995). Es bestehen extensive Interaktionen zwischen Slu7p, Prp17p, Prp18p und Prp8p, die in genetischen und biochemischen Studien identifiziert wurden (Ben-Yehuda, 2000; Umen & Guthrie, 1995). Prp22p, eine ATP abhängige RNA Helikase, vermittelt nicht nur die chemische Spleißing Schritt II Reaktion, sondern ist auch an der Freisetzung der mRNA unter ATP-Hydrolyse beteiligt (Schwer & Gross, 1998). Von diesen Spleißing Faktoren des zweiten katalytischen Schrittes sind nur Prp8p und Prp16p essentiell. Prp17p spielt eine bedeutende Rolle in der Effizienz der 3' AG Erkennung und Transesterifizierungsreaktion (Frank & Guthrie, 1991; Dagher & Fu, 2001). Des weiteren sind in Hefe Prp18p, Slu7p und Prp22p bei Distanzen zwischen 3' AG Spleißstelle und Verzweigungsstelle weniger als 21 Nukleotiden entbehrlich (Brys & Schwer, 1996; Zhang & Schwer, 1997; Schwer & Gross, 1998). Nach der Vollendung des zweiten Spleißing Schrittes aktiviert Ntr1p die RNA Helikase Prp43p, welche die Freisetzung des Lariat-Introns einleitet (Tanaka *et al.*, 2007). Darüberhinaus wird vorgeschlagen, dass Prp43p die spleißosomale Disassemblierung in ATP abhängigen Konformationsänderungen ein oder mehrerer snRNPs initiiert (Arenas & Abelson, 1997). Das Intron wird schließlich

degradiert und die snRNPs für eine neue Runde der Intron Exzision freigesetzt (Brow, 2002; Will & Lührmann, 2001).

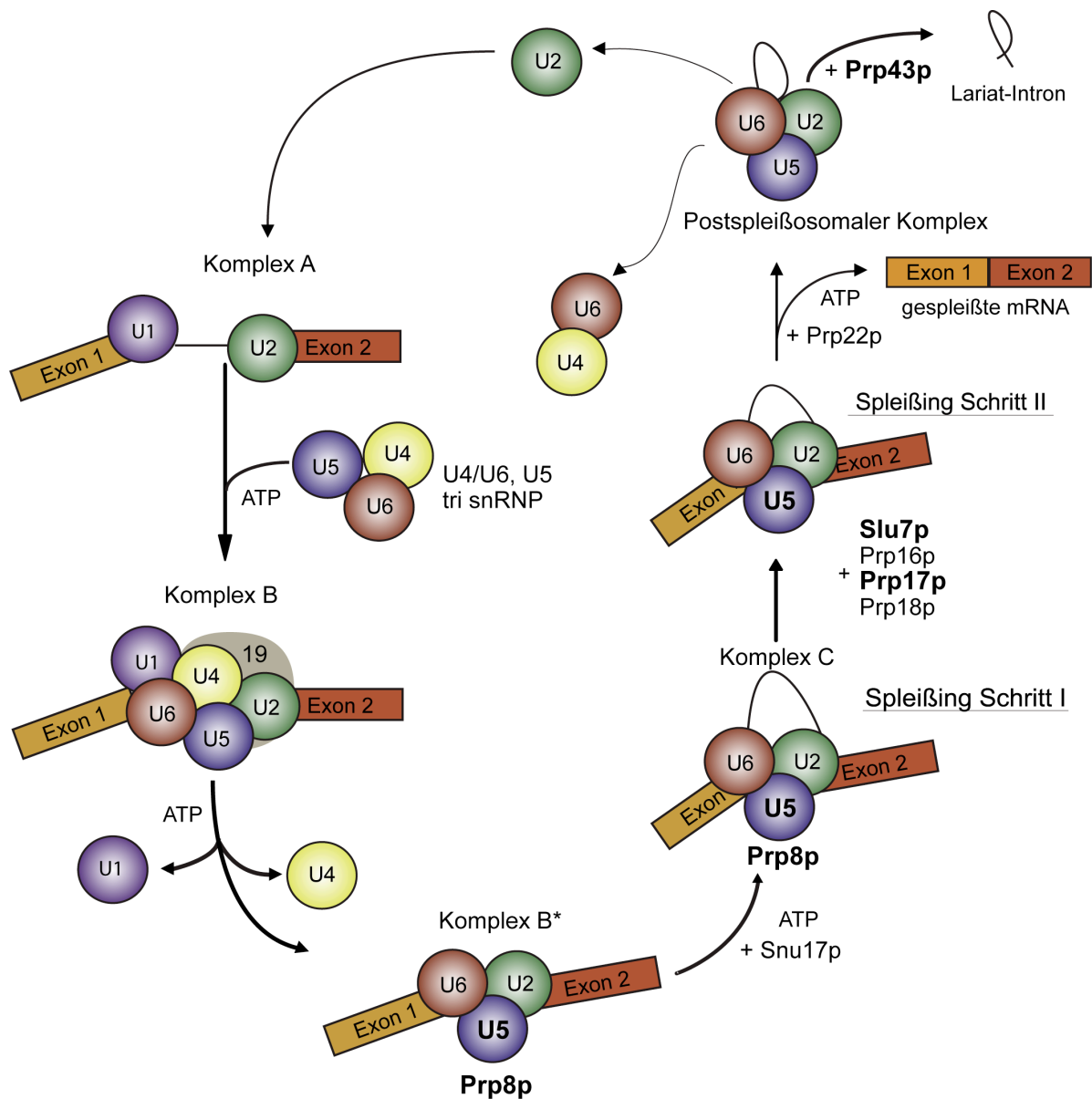


Abb. 6: Assemblierungs- und Disassemblierungszyklus der spleißosomalen snRNPs zum funktionalen Spleißosom. Die snRNPs sind als Kreise, die beiden Exons als Boxen und das Intron als Linie dargestellt. Nach der Assoziation der U1- und U2 snRNP Komplexe assoziiert ein tri-Komplex aus U4/U6 und U5 snRNP. Nach der Freisetzung der U1 und U4 snRNP Komplexe finden erneute vielfältige Neuansordnungen, Basenpaarungen und Konformationsänderung statt, die zur Bildung des katalytisch aktiven Spleißosoms führen. Nach Beendigung der Spleißing-Reaktionen I und II erfolgt die Freisetzung des Introns und der gespleißten mRNA. Der tri U snRNP Komplex disassembliert und ein neuer Zyklus beginnt. Für weitere Beschreibungen siehe Text. (Nach Wahl *et al.*, 2009)

Das snRNP Recycling erfolgt über die erneute Basenpaarung des U4 und U6 snRNP Komplexes, die durch die Dissoziation des transient gebundenen Prp24p wieder möglich wird (Rader & Guthrie, 2002; Raghunathan & Guthrie, 1998). Sowohl biochemische *in vitro*

als auch zytologische *in vivo* Studien in höheren Eukaryonten liefern Hinweise dafür, dass eine funktionelle Interaktion zwischen der RNA Polymerase II (CTD) und dem Spleißing Apparat bestehen (Beyer & Osheim, 1988; Bauren & Wieslander, 1994; Zhang *et al.*, 1994; Hirose *et al.*, 1999; LeMaire & Thummel, 1990; Tennyson *et al.*, 1995; Wuarin & Schibler, 1994). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass der Spleißing-Komplex bereits mit der proximalen Spleißregion interagiert, während die distale Spleißstelle selbst noch nicht synthetisiert wurde und das Entfernen der Introns vollzogen wird, noch während das elongierende Transkript mit der DNA verbunden ist (Osheim *et al.*, 1985; Beyer & Osheim, 1988; Neugebauer, 2002). Das alternative Spleißing findet oftmals post-transkriptional statt, was in einer langsameren Kinetik der Spleißing-Reaktion begründet liegen könnte (Neugebauer, 2002). Das ko-transkriptionale Spleißen in der Hefe wird ebenfalls diskutiert (Elliott & Rosbash, 1996; Kotovic *et al.*, 2003; Lacadie *et al.*, 2006), auch wenn hier bislang nur eine einzige Direktinteraktion experimentell bestätigt wurde. Der U1 snRNP Spleißingfaktor Prp40p, der Bestandteil des initialen Komplex E (CC) ist, interagiert mit der phosphorylierten CTD der RNA Polymerase II *in vitro* (Morris & Greenleaf, 2000).

1.7.4 3'-Endprozessierung und Polyadenylierung

Mit der Erkennung des hochkonservierten Polyadenylierungssignals (AAUAAA) 10-30 Basenpaare stromaufwärts der Spaltungs-/Polyadenylierungsstelle durch die RNA Polymerase II wird die 3' Endprozessierung eingeleitet. Diese mRNA Prozessierung erfolgt in zwei Schritten: zunächst wird die mRNA Vorläuferstruktur endonukleolytisch mit Hilfe der Faktoren CFIp und CFIIp (CstF, CF Im, CF Iim, CPSF in *Mammalia*) gespalten (Jenny *et al.*, 1994; Jenny & Keller, 1995). Die folgende Polyadenylierung am 3'-Ende erfordert den Polyadenylierungsfaktor PFI, die Poly(A) Polymerase (Pap) und CFI sowie dessen Komponenten Rna14p und Rna15p. Das hochkonservierte pendelnde Poly(A) mRNA Bindeprotein Pab1p (PABP in höheren Eukaryonten) interagiert mit Rna15p und kontrolliert die Länge des Poly(A) Schwanzes (Amrani *et al.*, 1997; Minvielle-Sebastia *et al.*, 1997). Zuletzt wurde ein weiteres pendelndes mRNA Bindeprotein (Hrp1p) identifiziert, welches mit den humanen hnRNP Proteinen verwandt ist. Hrp1p stellt eine weitere Untereinheit des CFI-Komplexes dar und trägt damit ebenso zu der 3' Endprozessierung bei. Pab1p und Nab2p unterstützen als pendelnde mRNA Bindeproteine die Verbindung von 3'-Endprozessierung und mRNA Export (Kessler *et al.*, 1997; Huang & Carmichael, 1996a).

1.7.5 mRNA Export

Mit dem Transkriptionszyklus und den ko-transkriptionalen mRNA Prozessierungen eng verbunden, sind auch die ko-transkriptionalen Rekrutierungen von mRNA Bindeproteinen, die die RNA Integrität und die Ausbildung zum finalen Export kompetenten mRNP-Komplex gewährleisten. Die ko-transkriptionale Rekrutierung des in eukaryontischen Zellen hoch konservierten TREX-1-Komplexes vermittelt die Verbindung von Transkription und mRNA Export. Dieser mRNA Exportweg erfolgt nicht über die Karyopherine und dem mit ihnen assoziierten RanGTPase-System (Neville & Rosbash, 1999; Clouse *et al.*, 2001). Der TREX-1- (Transport/Export) -Komplex besteht zum einen aus dem THO-Komplex. Dieses heterotetramere Gebilde setzt sich aus den Proteinkomponenten Hpr1p, Mft1p, Thp2p und dem Namen gebenden Tho2p zusammen und assembliert während der Transkriptionselongation an aktiv transkribierenden Genen (Rondon *et al.*, 2003; Chavez & Aguilera 1997; Piruat & Aguilera 1998; Chavez *et al.* 2000; Strässer *et al.* 2002). Er unterstützt die RNA Polymerase II vermittelte Transkriptionselongation durch die Unterbindung von RNA-DNA Hybridstrukturbildungen (Huertas *et al.* 2006). Er wird außerdem benötigt für eine effiziente nukleäre Degradation defekter RNAs (Das *et al.*, 2000, Das *et al.*, 2003). Die mRNA-Exportfaktoren Sub2p (UAP56 in höheren Eukaryonten) und Yra1p (Aly/REF in *Mammalia*) binden an diesen Komplex und komplettieren den TREX-1-Komplex. Die RNA Helikase Sub2p (UAP56 in Vertebraten) wurde initial als Spleißingfaktor identifiziert, die jedoch über den THO-Komplex sowohl auf Intron-haltige als auch Intron-lose Gene (Zhang & Green, 2001; Jensen *et al.*, 2001) transferiert wird. Die Interaktion von Sub2p mit dem THO-Komplex und der mRNA führt zur weiteren Rekrutierung des mRNA Bindeproteins Yra1p (Jensen *et al.*, 2001; Strässer & Hurt, 2001; Jimeno & Aguilera, 2010). Tex1p, ein Protein von noch unaufgeklärter Funktion, assoziiert ebenfalls stabil mit der mRNA über den TREX-1-Komplex (Strässer *et al.*, 2002). Im Szenario der Verknüpfung von Export kompetenter mRNP Bildung und nukleärem Export spielt das Rezeptor-Heterodimer Mex67p-Mtr2p (TAP-p15 in höheren Eukaryonten) eine Schlüsselfunktion. Bislang ist bekannt, dass mRNA gebundenes Yra1p mit der N-terminalen Domäne von Mex67p direkt interagiert. Yra1p assoziiert allerdings nicht mit allen Transkripten, die von Mex67p transportiert werden. Außerdem ist Yra1p ausschließlich im Zellkern lokalisiert (Strässer & Hurt, 2000; Stutz *et al.*, 2000; Zenklusen *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu pendelt Npl3p zwischen Zellkern und Zytoplasma hin und her und ist nach derzeit akzeptierten Modell als Export-Adapter für den Export Rezeptor Mex67p-Mtr2p bekannt (Gilbert & Guthrie, 2004; 1.10). Mtr2p ist diejenige Komponente des Rezeptor-Heterodimers Mex67p-Mtr2p, welche direkt mit den FG-reichen Domänen der Nukleoporene interagiert und so den Translokationsprozess vermittelt (Kohler & Hurt, 2007). Der TREX-1-Komplex ist weiterhin mit dem Exosom, einem 3'-5' Exonuklease-Komplex, verbunden, der die Degradation von

fehlerhaften mRNAs durchführt und auch eine weitere Funktion bei der rRNA Prozessierung einnimmt (Das *et al.*, 2003). Die Erkennung von fehlerhaften mRNAs erfolgt im Zellkern, wenn Transkripte durch ein Fehlen des TREX-1-Komplexes und damit auch der Export Maschinerie markiert sind. Die mRNAs werden auf diese Weise dem Abbau zugeführt (Andrulis *et al.*, 2002; Libri *et al.*, 2002; Zenklusen *et al.*, 2002). Ein weiterer interessanter Kontrollmechanismus, der falsch gefaltete oder unvollständig prozessierte mRNAs im Zellkern zurückhält, befindet sich direkt an den Kernporen-Komplexen. Dieser Komplex der Qualitätskontrolle besteht aus den Proteinen Mlp1p, Mlp2p, Pml39p, Nup60p, Esc1p und Pml1p (Fasken & Corbett, 2009). Das derzeit am besten charakterisierte Protein in diesem Komplex ist das nicht essentielle Mlp1p (Green *et al.*, 2003). Es interagiert mit Nup60p auf der zellkernplasmatischen Seite und mit den Komponenten des mRNP Komplexes Nab2p, Yra1p und Npl3p (Fasken & Corbett, 2009).

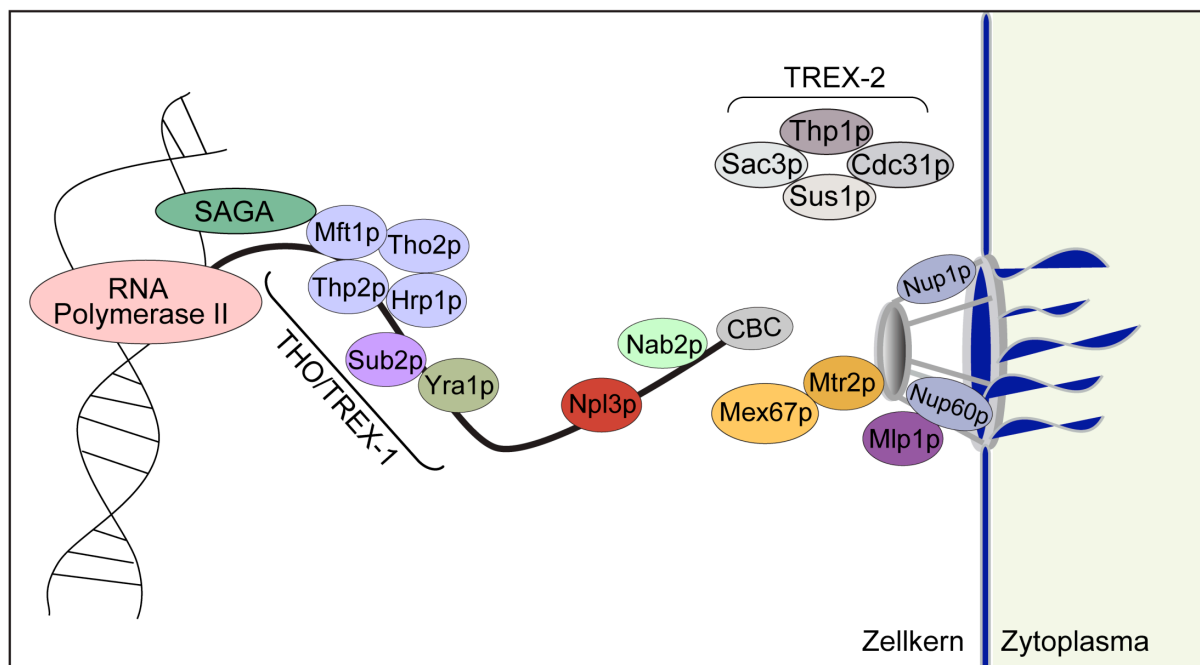


Abb. 7: Schematische Darstellung des mRNA Exports. Noch während der Transkription assoziiert der SAGA-Komplex und die mRNA bindenden Faktoren des THO/TREX-1-Komplexes. Sus1p interagiert mit dem SAGA-Komplex und leitet damit mRNAs in die Nähe der Kernporen-Komplexe. Yra1p und Npl3p rekrutieren nach derzeitigem Modell den Export-Rezeptor Mex67p-Mtr2p, der die Translokation der mRNA durch die Kernporen vermittelt. Des weiteren interagieren Nab2p und Npl3p mit Mlp1p, einem Kernporen-Komplex assoziierten Faktor, dem eine besondere Funktion in der finalen mRNA Qualitätskontrolle zugeschrieben wird. (Modell modifiziert nach Corbett & Krebber, 2004).

Im Hinblick auf seine Kontrollfunktion konnte gezeigt werden, dass in einer *MLP1* Deletion ungespleißte Reporterkonstrukte im Zytoplasma verstärkt akkumulieren (Galy *et al.*, 2004). Wie der genaue Mechanismus dieser Qualitätskontrolle funktioniert, ist noch unklar.

Ein weiterer Komplex, TREX-2, der in der Nähe der Kernporen-Komplexe lokalisiert ist, wurde erst seit kurzem charakterisiert. Er besteht aus den bisher identifizierten

Komponenten Thp1p, Cdc31p, Sac3p und Sus1p. Er scheint eine bislang noch nicht vollständig geklärte Funktion in der mRNP Biogenese und dem Export einzunehmen. Mutationen der TREX-2-Komplex Faktoren ähneln denjenigen Transkriptions- und mRNA Export-Defekten, die durch mutierte oder deletierte THO-Komplex Komponenten ausgelöst werden (Fischer *et al.*, 2002; Fisher *et al.*, 2004; Gallardo *et al.*, 2003; Rodriguez-Navarro *et al.*, 2004; Gonzales-Aguilera, 2008). Die Verbindung zum Transkriptionsprozess erfolgt vermutlich über die identifizierten Interaktionen von Sus1p und Thp1p mit dem SAGA-Komplex („Spt-Ada-Gcn5 acetyltransferase“-Komplex), der an der Transkriptionsinitiation und an der Transkriptionselongation beteiligt ist (Rodriguez-Navarro *et al.*, 2004). Die TREX-2 Komponenten Sus1p und Cdc31p unterstützen zudem die Assoziation mit den Kernporen-Komplexen über eine Interaktion mit dem Nukleoporin Nup1p (Jani *et al.*, 2009) (Abb. 7). Durch diese Beobachtungen wird dem TREX-2-Komplex auch eine Funktion in der frühzeitigen Positionierung von aktiv transkribierten mRNAs in die räumliche Nähe der Kernporen-Komplexe zugeschrieben, die somit den mRNA Export Prozess unterstützen (Fischer *et al.*, 2002, Fischer *et al.*, 2004, Rodriguez-Navarro *et al.*, 2004; Jani *et al.*, 2009).

1.8 Die Familie der SR-Proteine in höheren Eukaryonten

Serin-Arginin (SR-) reiche Proteine interagieren in höheren Eukaryonten mit den frühen spleißosomalen Komponenten des U1 und U2 snRNP Komplexes (Bourgeois *et al.*, 2004; Lin & Fu, 2007). Sie wirken sowohl im konstitutiven als auch im alternativen Spleißingprozess als Spleißingfaktoren. Die SR-Protein vermittelte Erkennung und Bindung von sog. ESE- („exonic splicing enhancer“) Sequenzen führt zu einer Erkennung von schwach konservierten 5'- und 3'-SS Signalen im Prozess des alternativen Spleißens (Maniatis *et al.*, 1991; Lam & Hertel, 2002). Das alternative Spleißen trägt zur Erhöhung der Proteomvielfalt in höheren Eukaryonten bei und wird gewebe- und entwicklungsspezifisch reguliert. Für die mRNA Bindung weisen die SR-Proteine eine bis zwei RNA Erkennungsmotive („RNA recognition motifs“, RRM) am aminoterminalen Ende auf. Ihre carboxyterminale reversibel phosphorylierbare SR-Domäne zeichnet sich durch zahlreiche aufeinanderfolgende Wiederholungen der Dipeptide RS oder SR aus (Graveley & Maniatis, 1998; Sapra *et al.*, 2009; Blencowe, 2006; Shen & Green, 2006; Shen *et al.*, 2004; Wu & Maniatis, 1993). Innerhalb der SR-Protein Gruppe gibt es sowohl zwischen Zytoplasma und Zellkern pendelnde als auch ausschließlich im Zellkern verbleibende SR-Proteine (Sapra *et al.*, 2009; Caceres *et al.*, 1998; Gama-Carvalho *et al.*, 2001). Die drei SR-Proteine ASF/SF2, 9G8 und SRp20 wurden als pendelnde mRNA Bindeproteine neben der Spleißingfunktion auch in Verbindung mit dem mRNA Export gebracht (Huang & Steitz, 2001; Bourgeois *et al.*,

2004; Maquat, 2004; Sanford *et al.*, 2004; Hautbergue *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2003). Während eine Phosphorylierung der Namen gebenden SR-Domäne im Beispiel von ASF/SF2 die Spleißing Aktivität des Proteins *in vitro* erhöht (Xiao & Manley, 1997; Blaustein *et al.*, 2005; Sanford *et al.*, 2005), bewirkt die Hypophosphorylierung von ASF/SF2, 9G8 und SRp20 nach dem Spleißvorgang die Rekrutierung des Export-Rezeptors TAP (Mex67p in Hefe) (Huang *et al.*, 2004; Tenenbaum & Aguirre-Ghiso, 2005; Hargous *et al.*, 2006). TAP interagiert mit p15 (Mtr2p in Hefe), welches für den Translokationsprozess mit den Nukleoporinen der Kernporen-Komplexe direkt interagiert.

1.9 Die Familie der SR-ähnlichen Proteine in *S. cerevisiae*

In der Bäckerhefe werden keine explizit funktionell charakteristischen SR-Proteine kodiert und diejenigen Gene, die über eine Intronsequenz verfügen, zeichnen sich in den meisten Fällen durch strikt konservative Spleißingerkennungssignale aus (Dagher & Fu, 2001). Es wurden bislang nur zwei sehr seltene Fälle alternativer Spleißingssignale für die Gene Sus1p und Fes1p vorgeschlagen (Yassour *et al.*, 2009). Ein alternativer Spleißingprozess in *S. cerevisiae* wurde bislang nicht charakterisiert.

In *S. cerevisiae* existieren jedoch die drei SR-ähnlichen Proteine Npl3p, Gbp2p und Hrb1p. Sie verfügen ebenso wie die SR-Proteine der höheren Eukaryonten über 8-12 konzentriert angelegte SR-Dipeptidwiederholungen, die von RGG Tripeptiden umgeben werden und die sog. SR/RGG-Domäne bilden. Ebenso verfügen sie über zwei bis drei RRM Motive (Abb. 7) (Gilbert *et al.*, 2001; Häcker & Krebber, 2004). Sie pendeln als klar identifizierte mRNA Bindeproteine im Verband mit dem mRNP-Komplex durch die Kernporen hindurch in das Zytoplasma (Windgassen *et al.*, 2004; Windgassen & Krebber, 2003; Häcker & Krebber, 2004). Alle drei SR-ähnlichen Proteine dissoziieren im Zytoplasma während der Translationsphase von der mRNA und werden spezifisch über die NLS-Sequenz in der SR/RGG-Domäne von ihrem Importrezeptor Mtr10p erkannt und zurück in den Zellkern transportiert. Analog wird der Reimport der pendelnden SR-Proteine in den höheren Eukaryonten über den homologen Importrezeptor Transportin-SR vermittelt (Lei *et al.*, 2001). Des Weiteren wurde für Npl3p und Gbp2p eine spezifische Serinphosphorylierung durch die zytoplasmatische Kinase Sky1p gezeigt (Gilbert *et al.*, 2004; Lukasiewicz *et al.*, 2007), die eine hohe Sequenzähnlichkeit zur SR-Protein spezifischen Kinase 1 (SRPK1) in *Mammalia* aufweist (Siebel *et al.*, 1999; Dagher & Fu, 2001). Alle drei SR-ähnlichen Proteine weisen im Gleichgewichtszustand eine nukleäre Lokalisation auf. Diese nukleäre Verteilung könnte darin begründet liegen, dass im Pendelzyklus der mRNA assoziierte Exportprozess

langsamer verläuft als der Mtr10p vermittelte Reimport in den Zellkern oder aber die nukleären Funktionen mehr Zeit in Anspruch nehmen als die zytoplasmatischen.

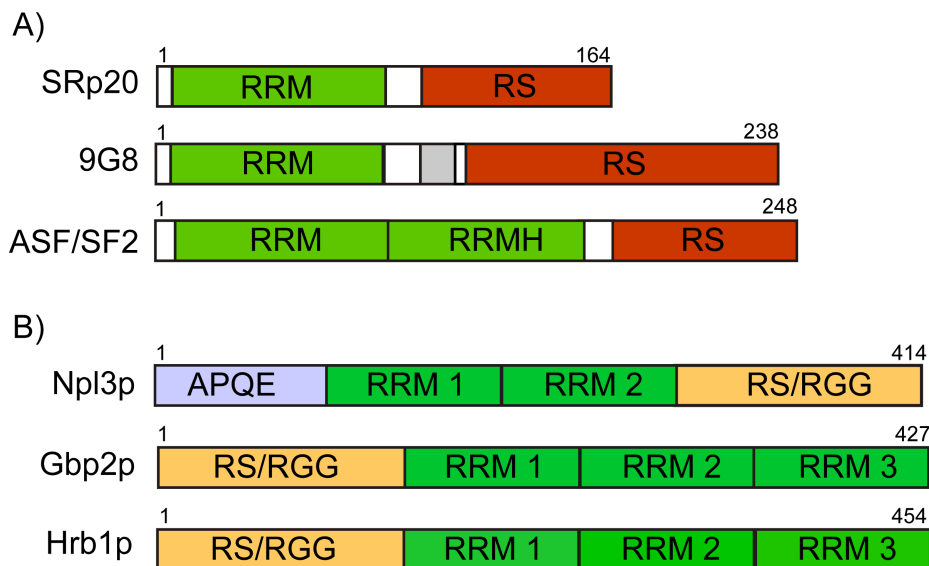


Abb. 8: Vergleichende Darstellung der Proteindomänen von A) SR-Proteinen der höheren Eukaryonten und B) der SR-ähnlichen Proteine in *S. cerevisiae*. RRM: „RNA recognition motif“; RS: Serin-Arginin Dipeptid Wiederholungen; RGG: Arginin-Glyzin-Glyzin Tripeptid Wiederholungen; APQE: Aminosäuren Sequenzwiederholungen aus Alanin (A), Prolin (P), Glutamin (Q) und Glutaminsäure (E). Adaptiert nach Huang & Steitz, 2005; Häcker & Krebber, 2004.

1.10 Npl3p

Npl3p („Nuclear Protein Localization“) sticht aus der Gruppe der SR ähnlichen Proteine durch seine besonderen Motiv-Homologien zu dem SR-Protein ASF/SF2 der höheren Eukaryonten hervor (Abb. 6). Npl3p zeichnet sich durch eine carboxyterminale SR/RGG-Domäne aus, die zugleich ein NLS Signal umfaßt. Darüberhinaus liegen in diesem Bereich drei GAR-Domänen, die sich durch einen hohen Anteil an Glyzin und Arginin auszeichnen und von einem Prolin flankiert werden. Diese binden unspezifisch einzelsträngige Nukleinsäuren (Burd & Dreyfuss, 1994; Birney *et al.*, 1993). Die RNA-Bindungsaffinität der GAR-Domäne wird vermutlich infolge posttranslationaler Methylierungen der Argininreste reguliert. Npl3p enthält zwei RRM Motive sowie eine APQE-Domäne am äußersten N-Terminus, dessen funktionelle Bedeutung noch nicht geklärt ist (Deka *et al.*, 2008; Senger *et al.*, 1998). Npl3p interagiert mit der CTD der RNA Polymerase II und wird auf diese Weise während der Transkriptionsinitiation auf die prä-mRNA geladen (Lee *et al.*, 1996; Shen *et al.*, 2000; Lei *et al.*, 2001). Darüberhinaus effektiviert Npl3p vermutlich nicht nur die Transkriptionselongation, sondern das Protein wurde kürzlich auch als Faktor identifiziert,

der die ko-transkriptionale Rekrutierung von Spleißingfaktoren der früh assemblierenden U1 und U2 snRNP Komplexe unterstützt (Kress *et al.*, 2008). Damit wurde erstmalig eine Verbindung eines SR-ähnlichen Proteins mit dem Spleißingvorgang in Hefe beschrieben. Des weiteren wurde für Npl3p eine Kompetition um Bindestellen vorgeschlagen, die einer frühzeitigen 3' Endprozessierung, Polyadenylierung und Termination durch kryptische Polyadenylierungssignale entgegen wirkt (Bucheli & Buratowski, 2005; Bucheli *et al.*, 2007; Dermody *et al.*, 2008). Während der 3' Endprozessierung wird die Sky1p vermittelte zytoplasmatische Phosphorylierung von Npl3p am Serin 411 durch die nukleäre Phosphatase Glc7p aufgehoben (Gilbert & Guthrie, 2004; Izaurralde, 2004). Nach bisherigem Modell führt diese Npl3p Dephosphorylierung zu einer verstärkten Interaktion mit dem Exportrezeptor Heterodimer Mex67p-Mtr2p (Gilbert & Guthrie, 2004), womit Npl3p eine Export-Adapter Funktion zugeschrieben wurde. Die Phosphorylierung durch die zytoplasmatische Kinase Sky1p verstärkt hingegen die Bindeaffinität zum Importrezeptor Mtr10p im Zytoplasma. Wird das durch Sky1p spezifisch phosphorylierbare Serin an Position 411 gegen ein Alanin ausgetauscht, so führt dies zu einer verlangsamten Npl3p Importrate, die sich in einer zytoplasmatischen Anreicherung auswirkt (Gilbert *et al.*, 2001; Senger *et al.*, 1998; Yun & Fu, 2000), wobei diese Mutation auch in der Mtr10p-Binderegion liegt und daher einen Einfluß auf die Import-Effizienz haben könnte. Zunächst wurde auch vermutet, daß eine Phosphorylierung durch Sky1p einen Beitrag zur mRNA Dissoziation im Zytoplasma leistet. Es wurde jedoch experimentell bestätigt, dass vielmehr ausschließlich Mtr10p die mRNA Dissoziation von Npl3p im Zytoplasma gewährleistet (Windgassen *et al.*, 2004). Eine weitere posttranslationale Proteinmodifikation wird über die nukleäre Arginin-Methyltransferase Hmt1p („hnRNP methyltransferase“) gewährleistet. Dabei werden vor allem die RGG Sequenzen der C-terminalen SR Domäne dimethyliert, welches die Exportrate steigert (McBride *et al.*, 2005; Henry & Silver, 1996; Shen *et al.*, 1998; Valentini *et al.*, 1999). Die regulatorische Bedeutung dieser Modifikation wird jedoch noch nicht völlig verstanden (Birney *et al.*, 1993).

1.11 Gbp2p

Gbp2p („G-strand binding protein“) wurde vor seiner Klassifizierung als pendelndes SR-ähnliches mRNA Bindeprotein in Verbindung mit einzelsträngigen Telomersequenzen gebracht. Dieses Protein bindet G-Strang Telomersequenzen $(TG_{1-3})_n$ *in vitro* (Lin & Zakian, 1994) und reguliert möglicherweise die Länge der Telomer-Enden (Pang *et al.*, 2003). Des weiteren beeinflusst Gbp2p die Lokalisation des Telomer-assoziierten Proteins Rap1p *in vivo* (Konkel *et al.*, 1995).

Gbp2p weist mit seinen drei RRM Motiven und einer N-terminalen SR/RGG-Domäne eine Sequenzübereinstimmung mit Npl3p von 27% auf. Die Homologie zu Hrb1p ist mit 47% besonders signifikant. Gbp2p und Hrb1p interagieren mit den Komponenten des an der Transkription und dem mRNA-Export beteiligten THO-Komplex und werden wie derzeit vermutet von diesem im Verlauf der Transkriptionselongation auf die prä-mRNAs transferiert (Häcker & Krebber, 2004; Hurt *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu Gbp2p und Hrb1p wird Npl3p in seiner Rekrutierung nur von der RNA Polymerase II und nicht vom THO-Komplex beeinflusst (Lei *et al.*, 2001; Häcker & Krebber, 2004; Hurt *et al.*, 2004).

Gbp2p und Npl3p sind im Gegensatz zu Hrb1p bei ihrer Überexpression vorrangig nukleär. Überexpressionen von Gbp2p und Npl3p führen jedoch zu mRNA Export-Defekten und stark verminderten Wachstumsraten (Windgassen & Krebber, 2003). Der Protein-Import von Gbp2p zurück in den Zellkern ist abhängig von dem Importrezeptor Mtr10p und auch von der zytoplasmatischen Kinase Sky1p. Die Deletionen beider Gene oder die Aminosäure-Austausche spezifischer Serin-Reste in der SR/RGG-Domäne von Gbp2p führen zu einer Verschiebung der nukleären Verteilung hin zu einer zytoplasmatischen Anreicherung von Gbp2p. Da eine Deletion von *MTR10* auch die mRNA Bindung von Gbp2p verstärkt, wird vermutet, dass Mtr10p die Dissoziation von Gbp2p von der mRNA ähnlich wie für Npl3p beschrieben, im Zytoplasma vermittelt (Windgassen & Krebber, 2003; Windgassen *et al.*, 2004).

1.12 Hrb1p

Hrb1p („Hypothetical RNA-binding protein“) weist eine zu Gbp2p vergleichbare Domänenstruktur mit N-terminaler SR/RGG Domäne und drei folgenden RRM Motiven auf. Die Homologien zu Npl3p liegen ähnlich wie für Gbp2p bei 23%. Hrb1p wurde ursprünglich als synthetisch letal Interaktionspartner des nicht essentiellen Nukleoporins Nup2p identifiziert (Shen *et al.*, 1998). Wie bereits beschrieben (1.11), wird Hrb1p nach derzeitigem Modell während der Transkriptionselongation auf die mRNA geladen und pendelt im Verband mit der mRNA in das Zytoplasma. Im Gegensatz zu Gbp2p und Npl3p bewirkt eine Überexpression von Hrb1p weder ein stark vermindertes Zellwachstum noch führt sie zu mRNA Export Defekten. Sie führt jedoch zu einer starken zytoplasmatischen Anreicherung, die in einer Transport-Übersättigung des spezifischen Importrezeptors Mtr10p begründet liegt (Häcker & Krebber, 2004) und Grund für die nicht vorhandenen Wachstums- und mRNA Export-Defekte darstellen könnte. Eine gleichzeitige Überexpression von Mtr10p kann die normale nukleäre Lokalisation von Hrb1p wiederherstellen (Häcker & Krebber, 2004). Eine Deletion von *SKY1* führt im Gegensatz zu Gbp2p nur zu einer leichten

Lokalisationsverschiebung von Hrb1p in das Zytoplasma. Ob Hrb1p als endogenes Substrat der Sky1p Kinase angesehen werden kann, wird kontrovers betrachtet (Häcker & Krebber, 2003; Porat *et al.*, 2006). Gbp2p und Hrb1p sind eindeutig als Bestandteile des mRNP Komplexes definiert und dennoch führen diese nicht essentiellen Faktoren in ihren Deletionen zu keinen visualisierbaren mRNA Export Defekten. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese mRNA Bindeproteine Adaptoren für die Erkennung spezifischer mRNAs sind (Rougemaille *et al.*, 2008; Windgassen & Krebber, 2003).

1.13 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Das mRNA Bindeprotein Npl3p mit seiner bereits bekannten mRNA Export Funktion zeigte eine Ko-Sedimentation mit Polysomen, die auf eine Bindung mit der mRNA noch während des Translationsprozesses hindeuten (Windgassen *et al.*, 2004). Des weiteren zeigte eine *np13*-Mutante auch eine inhibitorische Wirkung auf den Translationsprozess bei fehlerhafter Dissoziation von der translatierten mRNA. Eine direkte Funktion neben dem mRNA Export auch in der Translation wurde daher nicht mehr ausgeschlossen und sollte mit Hilfe von *np13Δ* Deletionsstudien analysiert werden, die durch einen erstmalig identifizierten *NPL3* nicht essentiellen Stammhintergrund durchgeführt werden konnten.

Die Genexpression beginnt mit der Transkription der DNA zur mRNA im Zellkern und endet mit der Translation im Zytoplasma, die für die entsprechenden Proteine kodiert. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass die einzelnen Schritte der Genexpression funktionell eng miteinander verbunden sind. Der TREX-1-Komplex, der die nukleäre Transkription und die ko-transkriptionale mRNP-Assemblierung mit der finalen Rekrutierung von mRNA Export Faktoren verknüpft, ist eines dieser Beispiele.

Generelles Ziel dieser Arbeit war es, die Export Charakteristika der SR-ähnlichen mRNA Bindeproteine Npl3p, Gbp2p und Hrb1p in *S. cerevisiae* näher zu analysieren und miteinander zu vergleichen. Obwohl eine Vielzahl an mRNA Bindeproteinen bekannt sind, die die mRNA vom Zellkern in das Zytoplasma begleiten, wurde bislang nur Npl3p als mRNA Adapter Protein identifiziert, der den einzig bekannten Export-Rezeptor Mex67p-Mtr2p während des Exportprozesses bindet. Mögliche andere mRNA exportierende Adapter sind noch unbekannt wie auch potentielle weitere Export Rezeptoren neben Mex67p-Mtr2p noch nicht identifiziert worden sind. Auch sind wenige Beispiele bekannt, die erklären wie prä-mRNA Prozessierung und mRNP Biogenese mit dem Export verknüpft sind. Das wenig charakterisierte SR-ähnliche mRNA Bindeprotein Gbp2p, welches wie auch Hrb1p und Npl3p zwischen Zellkern und Zytoplasma pendelt, sollte mit Hilfe eines genetisch optischen Export

„Screens“ in seinen Exporteigenschaften näher charakterisiert und mit Hrb1p und Npl3p verglichen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte

| Verwendung | Gerät | Bezugsquelle |
|---|---|---|
| Fluoreszenzmikroskopie | Fluoreszenz-Mikroskop Leica DM6000B Fluoreszenz-Mikroskop Leitz Aristoplan und Digitalkamera ORCA C4742-95 Digitalkamera ORCA 1394 ER | Leica, Wetzlar/Deutschland Leitz, Wetzlar/Deutschland Hamamatsu Photonic, Herrsching/Deutschland Hamamatsu Photonic, Herrsching/Deutschland |
| Tetradendissektion | Tetradenmikroskop Nikon Eclipse E400 mit Mikromanipulator | Nikon, Düsseldorf/Deutschland |
| Zellzahlbestimmung und Charakterisierung von Zellmorphologien | Lichtmikroskop Leitz Biomol Typ 020-507.010 | Leitz, Wetzlar/Deutschland |
| Bakterienkultur | Rotationsschüttler AJ112 Brutschrank B6120 | Infors, Bottmingen/Schweiz Heraeus, Hanau/Deutschland |
| Hefekultur | Schüttelinkubator Innova 4230 Culture tube rotator SC1 Stuart tube rotator SB3 Brutschrank BK-600 | New Brunswick Scientific, Edison/USA Stuart Scientific, Redhill/England Dynalab Corp., Rochester/USA Heraeus, Hanau/Deutschland |
| Agarosegel-Elektrophorese | Wide Mini Sub Cell | BioRad Laboratories, Hercules/USA |
| SDS-Polyacrylamidgel-elektrophorese | Vertikales Gel Elektrophorese System Modell V15.17 | Biometra, Göttingen/Deutschland |
| Zentrifugation | Tischzentrifuge Biofuge Pico und Fresco Kühlzentrifuge Model J-6 M/E Kühlzentrifuge Model JS2-21 M/E Kühlzentrifuge Multifuge 3L-R Kühlzentrifuge Model Avanti J26-XP | Heraeus, Hanau/Deutschland Beckmann, München/Deutschland Beckmann, München/Deutschland Heraeus, Hanau/Deutschland Beckmann, München/ Deutschland |
| Heizblöcke | Thermomixer Comfort R Thermostat 5320 Ori-Block OB3 | Eppendorf, Hamburg/Deutschland BioRad Laboratories, München/Deutschland |
| Netzgeräte | Power Supply EV231 Power Pac 3000 Power Supply | Peqlab, Erlangen/Deutschland BioRad Laboratories, München/Deutschland |

| | | |
|--------------------------------|---|--|
| Microarrays | ScanArray Express Scanner | PerkinElmer Life Sciences, Rodgau/Deutschland |
| RT-PCR (qPCR) | MX3000P Real-time detection system | Stratagene, La Jolla/USA |
| PCR | PCR-Gerät Peltier Thermal Cycler PTC-200 | MJ Research, Waltham. Massachusetts/USA |
| Spektrophotometrische Analysen | Jasco TP 6300 Fluoreszenz Spektrometer BioMate3 UV-Vis Spectrophotometer Photometer SpectraMax 340 | Jasco®, Gross-Umstadt/Deutschland Thermo Fisher Scientific, Schwerte/Deutschland MWG-Biotech, Ebersberg/Deutschland |
| UV-Transilluminatoren | UV Transilluminator mit Videokamera, Monitor und Videoprinter P68E UV-Transilluminator 2040V mit Intas Geldokumentationssystem | IVP San Gabriel/USA Mitsubishi/Japan Stratagene, La Jolla/USA |
| Weitere Gerätschaften | Biolmager FLA-3000 Experion™ FastPrep®-24 Feinwaage Sartorius Research R200D Milli-Q Water Purification System Magnetrührer Ikamag Ret Mini hybridization Ofen NanoDrop PerfectBlue™ Semi-Dry Elektrobloetter pH-Meter inoLab pH 720 Röntgenfilmentwickler X-OMAT 2000 Processor Semy-Dry Blot-Apparatur Trans Blot SD Stickstofftank UV-Stratalinker 2400 Vakuum-Blotter mit Pressure control system Waage Sartorius Laboratories Wasserbad SW-21C, beheizbar Wasserbad Haake L. Vortex VF2 und Ika-Vibrax-VXR | FUJIFILM Europe GmbH, Düsseldorf/Deutschland BioRad Laboratories, Hercules/USA MP Biomedicals, Illkirch/Frankreich Sartorius, Göttingen/Deutschland Millipore, Eschborn/Deutschland IKA-Labortechnik, Staufen/Deutschland Biometra, Göttingen/Deutschland BioRad Laboratories, Hercules/USA Peqlab, Erlangen/Deutschland WTW, Weilheim/Deutschland Kodak, Rochester/USA BioRad Laboratories, Hercules/USA Messer-Griesheim, Düsseldorf/Deutschland Stratagene, La Jolla/USA Stratagene, La Jolla/USA Sartorius, Göttingen/Deutschland Julabo, Seelbach/Deutschland Thermo Haake, Karlsruhe/Deutschland IKA-Labortechnik, Staufen/Deutschland |

2.2 Chemikalien

| Chemikalien/Lösungen | Bezugsquelle |
|--|--|
| Agarose NEEO Ultra-Qualität | Roth, Karlsruhe/Deutschland |
| Amersham Hybond TM -N ⁺ Membran | GE Healthcare Europe GmbH, München/Deutschland |
| Ampicillin Natrium Salz | GERBU Biotechnik GmbH, Gailberg/Deutschland |
| α -[³² P]-ATP | Hartmann Analytik GmbH, Braunschweig/Deutschland |
| γ -[³² P]-ATP | Hartmann Analytik GmbH, Braunschweig/Deutschland |
| Bacto Yeast nitrogen base w/o amino acids | Becton Dickinson, Franklin Lakes/USA |
| Complete EDTA-free/Proteasen Inhibitoren | Roche Diagnostics, Mannheim/Deutschland |
| Cycloheximid | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen/Deutschland |
| DAPI | Merck, Darmstadt/Deutschland |
| DEPC Biochemica | AppliChem, Darmstadt/Deutschland |
| DTT | GERBU Biotechnik GmbH, Gailberg/Deutschland |
| dNTP's | Peqlab Biotechnologies, Erlangen/Deutschland |
| 5'-Fluoroorotsäure | ApolloScientific, Stockport/UK |
| Galaktose (D (+)) | Acros Organics, Geel/Belgien |
| Glukose | AppliChem, Darmstadt/Deutschland |
| Glasperlen 400-600 μ m | Kobe, Marburg/Deutschland |
| Hefeextrakt | Roth, Karlsruhe/Deutschland |
| IgG-Sepharose TM beads | Amersham Pharmacia, Uppsala/Schweden |
| IPTG | Roth, Karlsruhe/Deutschland |
| Luminol | Roth, Karlsruhe/Deutschland |
| Milchpulver | Roth, Karlsruhe/Deutschland |
| 2-Mercaptoethanol | Merck, Darmstadt/Deutschland |
| Nitrocellulose Membran (Protran [®]) | PerkinElmer TM Precisely, Waltham/USA |
| N-Propyl-Gallat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen/Deutschland |
| p-Coumaric acid | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen/Deutschland |
| PeqGold RNA Pure | Peqlab Biotechnologies, Erlangen/Deutschland |
| Pepton aus Casein | Roth, Karlsruhe/Deutschland |
| Perhydrol [®] 30% H ₂ O ₂ | Merck, Darmstadt/Deutschland |
| Poly-L-Lysin Hydrobromid | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen/Deutschland |
| Proteasen Inhibitor Cocktail | Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen/Deutschland |
| PMSF | Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen/Deutschland |
| Protein G Plus-Agarose | Santa Cruz Biotechnology Inc., SantaCruz/USA |
| Protein G Sepharose | Applied Biosystems, Foster City/USA |
| Raffinose (α -D) | Serva, Heidelberg/Deutschland |
| PVDF-Membran (Immobilon-P) | Millipore Corporation, Bedford/USA |
| Lachs Sperma-Träger DNA (SS-DNA) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen/Deutschland |

| | |
|----------------|---|
| SYBR Green Mix | Thermo Scientific, Waltham/USA |
| Triethanolamin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen/Deutschland |
| Triton X-100 | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen/Deutschland |
| tRNA | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen/Deutschland |
| X-Gal | Fermentas, St Leon-Rot, Deutschland |

2.3 Reaktionssysteme

| Kits | Bezugsquelle |
|--|---|
| CyScribe™ cDNA Post-labelling kit | GE Healthcare Europe GmbH, München/Deutschland |
| DECA Prime II kit | Ambion/Applied Biosystems, Foster City/USA |
| Experion™ RNA StdSens Analysis Kit | BioRad Laboratories, Hercules/USA |
| illustra™ CyScribe™GFX™ Purification kit | GE Healthcare Europe GmbH, München/Deutschland |
| Message Amp II aRNA Amplification kit | Ambion/Applied Biosystems, Foster City/USA |
| NucleoBond AX 100 | Macherey und Nagel, Düren/Deutschland |
| NucleoSpin® Extract 2 in 1 | Macherey und Nagel, Düren/Deutschland |
| Omniscript® Reverse Transcription kit | Qiagen, Hilden/Deutschland |
| QIAquick Nucleotide Removal kit | Qiagen, Hilden/Deutschland |
| RNeasy Mini Kit | Qiagen, Hilden/Deutschland |
| RNase free DNase I | Qiagen, Hilden/Deutschland |
| GenElute™ Plasmid Miniprep kit | Sigma-Aldrich, München/Deutschland |
| pGEM® -T Vektor System | Promega Corporation, Madison/USA |
| Turbo DNA-free™ | Ambion/ Applied Biosystems, Foster City/USA |

2.4 Enzyme und Antikörper

Verwendete Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen New England Biolabs, Beverly/USA und Fermentas, St Leon-Rot/Deutschland bezogen.

| Enzym | Bezugsquelle |
|--|--|
| Calf intestine alkaline phosphatase (CIAP) | Life Technologies, Karlsruhe/Deutschland |
| <i>Pfu</i> Turbo DNA Polymerase | Stratagene, La Jolla, USA |
| RiboLock RNase Inhibitor | Fermentas, St Leon-Rot, Deutschland |
| Ribonuklease A | AppliChem, Darmstadt/Deutschland |
| T4 DNA Ligase | Promega Corporation, Madison/USA |
| T4 Polynukleotid-Kinase | Life Technologies, Karlsruhe/Deutschland |
| <i>Taq</i> -DNA Polymerase | New England Biolabs, Beverly/USA |
| Zymolase 20T | Seikagaku corporation, Tokyo/Japan |

| Antikörper | Verdünnung | Bezugsquelle |
|--|------------|-------------------------|
| HRP konjugierter Anti Maus | 1:20000 | Dianova |
| HRP konjugierter Anti-Kanninchen | 1:20000 | Dianova |
| Kanninchen-Anti-Hem15 | 1:10000 | R. Lill/U. Mühlenhoff |
| Kanninchen-Anti-GFP | 1:1000 | Santa Cruz |
| Kanninchen-Anti-GFP | 1:5000 | P.A. Silver, Boston/USA |
| Kanninchen-Anti-myc | 1:1000 | Santa Cruz, Boston/USA |
| Kaninchen-Anti-Npl3 | 1:5000 | H. Krebber |
| Kanninchen-Anti-Protein A Bindeprotein (PAB) | 1:500 | P.A. Silver, Boston/USA |
| Kanninchen-Anti-Por | 1:5000 | R. Lill/U. Mühlenhoff |
| Maus-Anti-myc 9E10 | 1:5000 | M. Eilers |
| Maus-Anti-myc 9E10 | 1:1000 | SantaCruz |
| Maus-Anti-GFP | 1:1000 | SantaCruz |

2.5 Stämme

2.5.1 *Escherichia coli* Stämme

Die Amplifikation von Plasmid DNA wurde mit Hilfe des Bakterienstammes DH5α ((supE44 lacZU169(80lacM15) hsdR17 recA1 endA1) durchgeführt.

2.5.2 *Saccharomyces cerevisiae* Stämme

| S. cerevisiae-Stamm | Genotyp | Referenz/Quelle |
|---------------------|---|------------------------------|
| HKY35 | Wildtyp <i>MATα ura3-52 leu2Δ1 trp1Δ63</i> | Winston <i>et al.</i> , 1995 |
| HKY36 | Wildtyp <i>MATα ura3-52 leu2Δ1 his3-200</i> | Winston <i>et al.</i> , 1995 |
| HKY45 | <i>xpo1::LEU2 + CEN HIS3 xpo1-1</i> <i>MATα ura3 leu2 ade2</i> | Heike Krebber |
| HKY77 | <i>rpb1-1</i> <i>MATα ura3 his3 trp1</i> | R.A. Young |
| HKY127 | <i>rat7-1</i> <i>MATα ura3Δ52 leu2Δ1 his3Δ200</i> | Gorsch <i>et al.</i> , 1995 |
| HKY157 | <i>npl3::HIS3 + CEN URA3 NPL3</i> <i>MATα ura3 leu2</i> | Heike Krebber |
| HKY158 | <i>npl3::HIS3 + CEN LEU2 npl3-1</i> <i>MATα ura3 leu2 his3</i> | Lee <i>et al.</i> , 1996 |
| HKY159 | <i>npl3::HIS3 + CEN LEU2 npl3-3</i> <i>MATα ura3 leu2 his3</i> | Lee <i>et al.</i> , 1996 |
| HKY160 | <i>npl3::HIS3 + CEN LEU2 npl3-17</i> <i>MATα ura3 leu2 his3</i> | Lee <i>et al.</i> , 1996 |
| HKY161 | <i>npl3::HIS3 + CEN LEU2 npl3-41</i> <i>MATα ura3 leu2 his3</i> | Lee <i>et al.</i> , 1996 |
| HKY168 | <i>gbp2::HIS3</i> <i>MATα ura3 leu2 trp1 lys1 ade2 ade8</i> | Heike Krebber |

| | | |
|--------|--|-------------------------|
| HKY181 | HRB1-GFP:TRP1 <i>MATa ura3-52 leu2Δ1 trp1Δ63</i> | Heike Krebber |
| HKY291 | Wildtyp <i>MATa ura3Δ52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ63</i> | Heike Krebber |
| HKY298 | hrb1::kanMX4 <i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> | Euroscarf |
| HKY313 | sky1::kanMX4 <i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> | Euroscarf |
| HKY369 | gbp2::kanMX4 <i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> | Euroscarf |
| HKY380 | npl3::kanMX4 <i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> | Euroscarf |
| HKY381 | Wildtyp <i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> | Euroscarf |
| HKY408 | prt1-1 <i>MATa ura3 leu2 his3 trp1</i> | Mark Ashe |
| HKY432 | prp8-D908Y/E988K <i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3-200</i> | AG Krebber |
| HKY433 | prp8-D908Y/E988K <i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3-200</i> | AG Krebber |
| HKY622 | prp17::kanMX4 <i>MAT a ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0</i> | Euroscarf |
| HKY631 | prp17-Q336* <i>MATa ura3-52 leu2Δ1 trp1-63 ade</i> | Diese Arbeit |
| HKY680 | rna6-1 <i>MATa ade, his7, ura3-52 lys2</i> | Legrain & Rosbash, 1989 |
| HKY682 | npl3::kanMX4 <i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1</i> | AG Krebber |
| HKY701 | fun12::kanMX4 <i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0</i> | Euroscarf |
| HKY706 | gbp2::kanMX4 hrb1::kanMX4 + CEN URA3 NPL3 <i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> | AG Krebber |
| HKY707 | gbp2::kanMX4 hrb1::kanMX4 + CEN URA3 NPL3 <i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> | AG Krebber |
| HKY708 | npl3::kanMX4 hrb1::kanMX4 + CEN URA3 NPL3 <i>MATa ura3Δ0 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0</i> | AG Krebber |
| HKY716 | npl3::kanMX4 gbp2::kanMX4 hrb1::kanMX4 + CEN URA3 NPL3 <i>MATa ura3Δ0 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0</i> | AG Krebber |
| HKY820 | GBP2-3xMYC:HIS3 <i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3-200</i> | AG Krebber |
| HKY821 | HRB1-3xMYC:HIS3 <i>ura3-52 leu2Δ1 his3-200</i> | AG Krebber |
| HKY862 | rpl10::kanMX4 + CEN URA3 rpl10-G161D-GFP <i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> | AG Krebber |
| HKY878 | arx1::kanMX4 <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> | Euroscarf |
| HKY879 | prp17::kanMX4 hrb1::kanMX4 + CEN URA3 PRP17 <i>MATa his3Δ1 lys2Δ0 ura3Δ0 leu2Δ0</i> | Diese Arbeit |

| | | |
|--------|--|------------------------------|
| HKY880 | <i>hrb1::kanMX4 prp17::kanMX4 + CEN PRP17</i> (pHK 699) <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0</i> | Diese Arbeit |
| HKY881 | <i>prp17::kanMX4 gbp2::kanMX4 + CEN URA3 PRP17</i> (pHK 699) <i>MATα his3Δ1 lys2Δ0 ura3Δ0 leu2Δ0</i> | Diese Arbeit |
| HKY882 | <i>prp17::kanMX4 gbp2::kanMX4 hrb1::kanMX4 + CEN URA3 PRP17</i> (pHK 699) <i>MATα his3Δ1 lys2Δ0 ura3Δ0 leu2Δ0</i> | Diese Arbeit |
| HKY883 | <i>prp17::kanMX4 gbp2::kanMX4 hrb1::kanMX4 + CEN URA3 PRP17</i> (pHK 699) <i>MATα his3Δ1 lys2Δ0 ura3Δ0 leu2Δ0</i> | Diese Arbeit |
| HKY890 | <i>mtr2::HIS3 + CEN TRP1 mtr2-21 + CEN URA3 MTR2</i> <i>MATα ura3 leu2 his3 trp1 ade2</i> | Bassler <i>et al.</i> , 2001 |
| HKY892 | <i>mtr2::HIS3 + CEN TRP1 mtr2-33 + CEN URA3 MTR2</i> <i>MATα ura3 leu2 his3 trp1 ade2</i> | Bassler <i>et al.</i> , 2001 |
| HKY894 | <i>nmd3::kanMX4 + CEN TRP1 nmd3-2 + CEN URA3 NMD3</i> <i>MATα ura3 leu2 his3 lys2 trp1</i> | Bassler <i>et al.</i> , 2001 |
| HKY912 | <i>gbp2::kanMX4 prp8-D908Y/E988K + CEN URA3 PRP8</i> (pHK586) <i>MATα ura3 leu2 his3</i> | Diese Arbeit |
| HKY919 | <i>HRB1-3xMYC:HIS3 prp43::kanMX4 + CEN TRP1 prp43-S247A</i> <i>ura3 lys2 ade leu2</i> | Diese Arbeit |
| HKY920 | <i>GBP2-3xMYC:HIS3 prp43::kanMX4 + CEN TRP1 prp43-S247A</i> <i>ura3 lys2 ade leu2</i> | Diese Arbeit |
| HKY921 | <i>MFT1-TAP:HISMx6 prp8- D908Y/E988K + CEN URA3 PRP8</i> (pHK586) <i>MATα ura3 leu2</i> | Diese Arbeit |
| HKY922 | <i>prp17::kanMX4 MFT1-TAP:HISMx6</i> <i>MATα ura3 leu2</i> | Diese Arbeit |
| HKY923 | <i>hrb1::kanMX4 prp8-D908Y/E988K + CEN URA3 PRP8</i> (pHK586) <i>MATα ura3 leu2 his3</i> | Diese Arbeit |
| HKY944 | <i>MFT1-TAP:HISMx6</i> <i>MATα his3 his3Δ1 ura3Δ0 leu2Δ0 met15Δ0</i> | Open Biosystems |
| HKY963 | <i>prp43::kanMX4 + CEN TRP1 prp43-S247A</i> <i>MATα leu2 his7 trp1 ura3</i> | Martin <i>et al.</i> , 2002 |
| HKY965 | <i>slu7::kanMX4 + CEN TRP1 slu7-E215A-I216A-E217A (slu7-EIE)</i> <i>MATα ura3 leu2 his7 trp1</i> | James <i>et al.</i> , 2002 |
| HKY967 | <i>spt15 + CEN URA3 SPT15</i> (pHK794) <i>MATα ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200</i> | Diese Arbeit |
| HKY968 | <i>prp17::kanMX4 GBP2-3xMYC:HIS3</i> <i>MATα ura3 leu2 his3</i> | Diese Arbeit |
| HKY969 | <i>prp17::kanMX4 HRB1-3xMYC:HIS3</i> <i>MATα ura3 leu2 his3</i> | Diese Arbeit |

| | | |
|---------|--|-----------------|
| HKY1001 | MLP1-TAP:HISMX6 <i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0</i> | Open Biosystems |
| HKY1004 | PRP43-TAP:HISMX6 <i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0</i> | Open Biosystems |
| HKY1005 | prp17::kanMX4 <i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i> | Diese Arbeit |
| HKY1006 | prp17::kanMX4 npl3::kanMX4 + CEN URA3 PRP17 (pHK699) <i>MATa his3Δ1 ura3Δ0 leu2Δ0</i> | Diese Arbeit |
| HKY1007 | sky1::kanMX4 gbp2::HIS3 <i>MATa his3 leu2 ura3</i> | Diese Arbeit |
| HKY1008 | prp8-D908Y/E988K + CEN URA3 PRP8 (pHK586) <i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3-200</i> | Diese Arbeit |
| HKY1009 | sky1::kanMX4 gbp2::HIS3 <i>MATa ura3 leu2 his3</i> | Diese Arbeit |
| HKY1010 | prp43::kanMX4 gbp2::kanMX4 hrb1::kanMX4 + CEN TRP1 prp43-S247A + CEN URA3 GBP2-GFP <i>MATa leu2 his3</i> | Diese Arbeit |
| HKY1011 | prp43::kanMX4 npl3::kanMX4 + CEN TRP1 prp43-S247A <i>MATa leu2 his3</i> | Diese Arbeit |
| HKY1014 | prp17::kanMX4 prp8-D908Y/E988K + CEN URA3 PRP17 (pHK 699) <i>MATa ura3 leu2 his3</i> | Diese Arbeit |
| HKY1015 | prp43::kanMX4 gbp2::kanMX4 + CEN TRP1 prp43-S247A <i>MATa leu2 his3</i> | Diese Arbeit |
| HKY1016 | prp43::kanMX4 hrb1::kanMX4 + CEN TRP1 prp43-S247A <i>MATa leu2 his3</i> | Diese Arbeit |
| HKY1017 | npl3::kanMX4 prp8-D908Y/E988K + CEN URA3 PRP8 (pHK586) <i>ura3 leu2 his3</i> | Diese Arbeit |
| HKY1018 | gbp2::HIS3 hrb1::kanMX4 prp8-D908Y/E988K + CEN URA3 PRP8 (pHK586) <i>MATa ura3 leu2 his3</i> | Diese Arbeit |
| HKY1029 | prp17::kanMX4 sky1::kanMX4 <i>MATa leu2 his3 ura3</i> | Diese Arbeit |
| HKY1032 | npl3::kanMX4 prp8-D908Y/E988K <i>MATa leu2 his3 ura3</i> | Diese Arbeit |
| HKY1033 | GBP2-3xMYC:HIS3 prp8-D908Y/E988K <i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3-200</i> | Diese Arbeit |
| HKY1034 | HRB1-3xMYC:HIS3 prp8-D908Y/E988K <i>MATa ura3-52 leu2Δ1 his3-200</i> | Diese Arbeit |
| HKY1042 | GBP2-3xMYC:HIS3 mtr10::HIS3 + CEN TRP1 mtr10-7 <i>ura3 leu2</i> | Diese Arbeit |
| HKY1043 | HRB1-GFP:TRP1 GBP2-3xMYC:HIS3 <i>MATa ura3-52 leu2Δ1</i> | Diese Arbeit |

| | | |
|---------|--|--------------|
| HKY1044 | HRB1-GFP:TRP1 GBP2-3xMYC:HIS3 <i>MATα ura3-52 leu2Δ1</i> | Diese Arbeit |
|---------|--|--------------|

2.6 Plasmide

| Plasmid | Charakterisierung | Referenz/Quelle |
|---------|---|--|
| pHK19 | SPT15 <i>CEN URA3</i> | Heike Krebber |
| pHK20 | Mex67-GFP <i>CEN LEU2</i> | Segref <i>et al.</i> , 1998 |
| pHK87 | <i>CEN LEU2</i> | Christianson <i>et al.</i> , 1992 |
| pHK88 | <i>CEN URA3</i> | Christianson <i>et al.</i> , 1992 |
| pHK144 | P_{GAL1}-NPL3-GFP <i>2μ URA3</i> | Lee <i>et al.</i> , 1996 |
| pHK235 | P_{GAL1}-HRB1-GFP <i>2μ URA3</i> | Shen <i>et al.</i> , 1998 |
| pHK367 | GBP2-GFP <i>CEN URA3</i> | Windgassen <i>et al.</i> , 2004 |
| pHK419 | GFP-NPL3-RA8 <i>CEN LEU2</i> | Gilbert <i>et al.</i> , 2001 |
| pHK422 | P_{GAL1}-GBP2-GFP <i>2μ URA3</i> | Windgassen & Krebber, 2003 |
| pHK431 | P_{GBP2}-gfp2-S15A-GFP <i>CEN URA3</i> | AG Krebber |
| pHK492 | 3xMYC:HISMx6 | Knop <i>et al.</i> , 1999 |
| pHK537 | HRB1-GFP <i>CEN URA3</i> | Häcker & Krebber, 2004 |
| pHK571 | GBP2-S15A-GFP <i>2μ URA3</i> | AG Krebber |
| pHK576 | P_{GAL1}-HRB1-GFP <i>2μ URA3</i> | AG Krebber |
| pHK586 | PRP8 <i>CEN URA3</i> ("Rose Library" A4) | AG Krebber |
| pHK688 | 3xMYC-NPL3 <i>CEN URA3</i> | Shen <i>et al.</i> , 1998 |
| pHK699 | tk(CUU)D1, PRP17, SEM1 <i>CEN URA3</i> ("Rose Library" A3) | Diese Arbeit |
| pHK697 | RPS2-GFP <i>CEN URA3</i> | Milkereit <i>et al.</i> , 2003 |
| pHK698 | RPL25-GFP <i>CEN URA3</i> | Gadal <i>et al.</i> , 2001 |
| pHK697 | RPS2-GFP <i>CEN URA3</i> | Milkereit <i>et al.</i> , 2003 |
| pHK698 | RPL25-GFP <i>CEN URA3</i> | Gadal <i>et al.</i> , 2001 |
| pHK701 | P_{GAL1}-CYC1(ohne Intron)-lacZ <i>2μ URA3</i> | Guarente <i>et al.</i> , 1982 Legrain & Rosbash, 1989 |
| pHK702 | P_{GAL1}-CYC1(mit Intron)-lacZ <i>2μ URA3</i> | Guarente <i>et al.</i> , 1982 Legrain & Rosbash, 1989 |

| | | |
|--------|--|-------------------------------|
| pHK720 | NMD3-myc CEN LEU2 | Hedges <i>et al.</i> , 2005 |
| pHK744 | P_{ADH1}-GFP CEN URA3 | Weigand & Suess, 2007 |
| pHK745 | P_{ADH}-GFP-ACT1-Intron CEN URA3 | Weigand & Suess, 2007 |
| pHK749 | CEN URA3 | Weigand & Suess, 2007 |
| pHK750 | P_{ADH}-NLS-NES 3xMYC CEN URA3 | Diese Arbeit |
| pHK778 | 9xMYC-NPL3 CEN LEU2 | AG Krebber |
| pHK779 | 9xMYC-NPL3 CEN URA3 | AG Krebber |
| pHK794 | YER145C-A LSM5 SCC4 SPT15 YER148 W-A PEA2 CEN URA3 (C2 "Rose Library") | Diese Arbeit |
| pHK843 | ASK10 TEL2 ESP1 CEN URA3 (C1 "Rose Library") | Diese Arbeit |
| pHK892 | P_{ADH}-PRP17-GFP CEN URA3 | AG Krebber |
| pHK895 | P_{MET25}-THO2-GFP CEN HIS3 | Gallardo <i>et al.</i> , 2000 |
| pHK896 | P_{MET25}-THP1-GFP-GFP CEN HIS3 | Gallardo <i>et al.</i> , 2000 |
| pHK897 | P_{MET25}-HPR1-GFP CEN URA3 | Chavez <i>et al.</i> , 2000 |

2.7 Oligonukleotide

| Oligo-nukleotid | Nukleotidsequenz | Verwendung |
|-----------------|--|-----------------------------------|
| HK84 | 5'-TCCTGCTCGCTTCGC-3' | "Rose-Library" YCp50 "forward" |
| HK85 | 5'-GATATAGGCGCCAGC-3' | "Rose-Library" YCp50 "reverse" |
| HK322 | 5'-AGAATCGATTTGGCCGG-3' | ACT1 "forward" |
| HK323 | 5'-ATCTGGAAGTTCGTAGG-3' | ACT1 "reverse" |
| HK467 | 5'-GTAATGTTTCTCTGACCG-3' | PRP17 "forward" |
| HK468 | 5'-CCTCTACCTCTATCTGTT-3' | PRP17 "reverse" |
| HK526 | 5'-GGAGAAGAAGCTTTTCACTGG-3' | GFP „forward“ |
| HK527 | 5'-CCATGCCATGTGTAATCC-3' | GFP „reverse“ |
| HK553 | 5'-AAAAGGCCTATGGGTGAACAAAAGTTGATTTC-3' | 3 x MYC „forward“ |
| HK554 | 5'-TTTAGGCCTTCCGTTCAAGTCTTCTTC-3' | 3 x MYC „reverse“ |
| HK580 | 5'-CGACTTGGCCCAAGTCG-3' | ADH1 „forward“ |
| HK581 | 5'-GCACCAGCTGGCATACC-3' | ADH1 „reverse“ |
| HK641 | 5'-GGGTCGTATGCACAGTGC-3' | RPS13 „forward“ |
| HK642 | 5'-GGCAGTGGCGGATTTCG-3' | RPS13 „reverse“ |
| HK653 | 5'-CCTTAGTAACGGCGATGAAGCGG-3' | 25S rRNA „forward“ |
| HK654 | 5'-GGAATTTACCACTTAGAGCTGC-3' | 25S rRNA „reverse“ |
| HK655 | 5'-GGTTGATCCTGCCAGTAGTCATATGC-3' | 18S rRNA „forward“ |

| | | |
|-------|--|-------------------------|
| HK656 | 5'-CCAGCACAAGGCCATGCGATTC-3' | 18S rRNA „reverse“ |
| HK663 | 5'-CGCATCGATGAAGAACGCAGCG-3' | 35S rRNA „forward“ |
| HK664 | 5'-GCTTAAGTTCAGCGGGTACTCCTACC-3' | 35S rRNA „reverse“ |
| HK718 | 5'-CCGCTCGAGCTATGGGTTTAGTAGACGGTTATG-3' | <i>PRP17</i> „forward“ |
| HK719 | 5'-CGGGATCCCTAGTCACATACATATATCTTACCTG-3' | <i>PRP17</i> „reverse“ |
| HK724 | 5'-CCGCTCGAGCACGAGAAGTAGCAGCAACC-3' | <i>RPL30A</i> „reverse“ |
| HK725 | 5'-CGTTAAGGCCCAAAGACC-3' | <i>RPL30A</i> „forward“ |
| HK798 | 5'-GATTGAACAGATTGCCAGC-3' | <i>RPL23A</i> „forward“ |
| HK799 | 5'-GACCAGTGATGGCGGAAC-3' | <i>RPL23A</i> „reverse“ |
| HK816 | 5'-GGCAAGATACGGTGCTACTTC-3' | <i>RPL17B</i> „forward“ |
| HK817 | 5'-CTGAATGGGATGGCTCTTTGG-3' | <i>RPL17B</i> „reverse“ |
| HK839 | 5'-GGTATCGAATCCAAGCAACC-3' | <i>RPS23A</i> „forward“ |
| HK840 | 5'-GCTTTTCCTTCTTTTCTTTCCAC-3' | <i>RPS23A</i> „reverse“ |
| HK842 | 5'-CCAAGAACGTTTCTTGTTACAGACC-3' | <i>RPS6A</i> „forward“ |
| HK843 | 5'-CGTCATCTTCCTTGGACAAACC-3' | <i>RPS6A</i> „reverse“ |
| HK844 | 5'-GGCTCCTATTGAATACCTACTG-3' | <i>SIK1</i> „forward“ |
| HK845 | 5'-GACTAAACCTTCTGATATGTCTG-3' | <i>SIK1</i> „reverse“ |
| HK846 | 5'-GGACAAAAGTGTTTGCAACTAC-3' | <i>CBS1</i> „forward“ |
| HK847 | 5'-CCTGCTTGTGGTATATAGCAG-3' | <i>CBS1</i> „reverse“ |
| HK848 | 5'-CCAAACTATCCAGATTCTCCC-3' | <i>MMS2</i> „forward“ |
| HK849 | 5'-GGTTTCTCCTTCCTTCGGTTG-3' | <i>MMS2</i> „reverse“ |
| HK850 | 5'-GCTTTGGTTCACGATGGTCTAG-3' | <i>RPS12</i> „forward“ |
| HK851 | 5'-CCAGTTCTTGACAACAACAACG-3' | <i>RPS12</i> „reverse“ |

2.8 Molekularbiologische Methoden

2.8.1 Kultivierung von *E. coli*

Für die Vermehrung von Plasmid tragenden *E. coli* Zellen wurde jeweils eine Einzelkolonie in Luria-Bertani (LB)-Medium angeimpft, wobei dem autoklavierten Medium hitzelabiles Ampicillin (100 µg/mL) oder Kanamycin (30 µg/mL) nach Sterilfiltration zugegeben wurde, um eine Plasmid-kodierte Resistenzselektion vornehmen zu können. Die Inkubation der mit einer Einzelkolonie angeimpften Submerskultur erfolgte aerob über Nacht (bis zu 16 h) bei 37°C und 180 Umdrehungen pro Minute (Upm) auf einem Rotationsschüttler. Zur Bestimmung der Zelldichten wurde eine Trübungsmessung im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 600 nm durchgeführt. Für die Referenzwertbestimmung erfolgte ein Abgleich gegen das entsprechende Medium. Eine OD₆₀₀ von 1 entspricht einem Titer von 2 x 10⁸ Zellen/mL. Für die Kultivierung von Bakterienkolonien auf Festmediumplatten wurde dem LB-Medium vor dem Autoklavieren 1,5% (w/v) Agar zugesetzt.

LB-Medium (pH 7,5): (Sambrook *et al.*, 1989):

| | | |
|-----|---------|-------------------|
| 1,0 | % (w/v) | Pepton aus Casein |
| 1,0 | % (w/v) | NaCl |
| 0,5 | % (w/v) | Hefeextrakt |

α -Komplementations-Platten: (Sambrook *et al.* 1989):

| | | |
|-----|----|----------------------------------|
| 1 | mL | 100 mM IPTG in 70% (v/v) Ethanol |
| 5 | mL | 2% (w/v) X-Gal gelöst in DMF |
| 300 | mL | LB-Agar |

2.8.2 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Für die Kultivierung von *S. cerevisiae*-Zellen wurde das Hefevollmedium YPD verwendet. Im Falle einer gewünschten positiven Selektion auf Plasmid-kodierte oder genomlokalisierte Markergene, welche die Stoffwechselauxotrophie des Stammes aufheben, erfolgte die Anzucht in SD-Mangelmedium. Dieses Selektivmedium wurde so gewählt, dass es das Produkt des entsprechenden Stoffwechselweges nicht enthielt. Standardmäßig wurden Submerskulturen einer Einzelkolonie oder entsprechende Volumina einer Vorkultur angeimpft und in einem Röhrchenrotator (5-20 mL) inkubiert oder größere Volumina in Erlenmeyerkolben (200-400 mL) in einem Schüttelinkubator bei 25°C und 140 Upm inkubiert. Wurden Temperatur-sensitive (ts) Mutanten im Experiment verwendet, so wurden diese und wildtypische Kontrollstämme bei Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase ($1-5 \times 10^7$ Zellen/mL) zu den angegebenen Zeiten bei 37°C inkubiert. Zelldichten wurden durch Auszählen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer im Lichtmikroskop oder durch Trübungsmessungen in einem Spektralphotometer (2.1) bei einer Wellenlänge von 600 nm ermittelt. Zur Erstellung eines Nullabgleichs wurde die jeweilige Mediumslösung als Referenz herangezogen. Eine OD_{600} von 1 entspricht einer Zelldichte von ca. 5×10^7 Zellen/mL. Für die Herstellung von Gefrierdauerkulturen wurden Vermehrungsausstriche des jeweiligen *S. cerevisiae* Stammes in 1 mL 50% (v/v) Glycerin resuspendiert und bei -80°C gelagert.

YPD-Medium: (Rose *et al.*, 1990)

| | | |
|---|---------|-------------|
| 1 | % (w/v) | Hefeextrakt |
| 2 | % (w/v) | Pepton |
| 2 | % (w/v) | Glukose |

SD-Mangelmedium: (Rose *et al.*, 1990):

| | | |
|------|---------|---|
| 0,67 | % (w/v) | “Bacto yeast nitrogen base w/o amino acids” |
| 0,2 | % (w/v) | “Dropout”-Mix |

Die Ansätze wurden mit ddH₂O auf ein Volumen von 1 L eingestellt. Die Zugabe von 3% (w/v) Agar erfolgte für die Herstellung von entsprechenden Festmedien. Alle Medien wurden steril autoklaviert.

Induktion der Sporulation von *S. cerevisiae*:

Durch Übertragen der Zellen in Sporulationsmedium (Stickstoffmangel, Acetat als Kohlenstoffquelle) wird die Sporenbildung angeregt. Diese ist wichtig für die spätere genetische Analyse von Tetradsen von Diploiden durch Mikromanipulation (2.9.6).

Sporulations (Super-SPO)-Medium: (Rose *et al.*, 1990)Lösung 1:

| | | |
|-----|---------|--------------|
| 0,5 | % (w/v) | Hefeextrakt |
| 306 | mM | Kaliumacetat |

Lösung 2:

| | | |
|-----|----|------------|
| 5 | mM | Glukose |
| 0,4 | mM | Adenin |
| 0,7 | mM | Uracil |
| 0,4 | mM | Tyrosin |
| 0,2 | mM | Histidin |
| 0,3 | mM | Leucin |
| 0,2 | mM | Lysin |
| 0,2 | Mm | Tryptophan |

| | | |
|-----|----|--------------|
| 0,3 | mM | Methionin |
| 0,2 | mM | Arginin |
| 1,2 | mM | Phenylalanin |
| 5,9 | mM | Threonin |

Lösung 1 wurde steril autoklaviert und Lösung 2 steril filtriert. Beide Lösungen wurden im Verhältnis 1:1 zusammengegeben und gemischt.

Negativselektion von *URA3*-Marker Plasmiden bzw. Positivselektion von Uracil auxotrophen Hefezellen:

FOA-Medium-Agarplatten wurden verwendet, um auf Plasmid-kodierte *URA3*-Markergene negativ zu selektionieren. Da Enzyme des Uracil Syntheseweges 5'-Fluoroorotsäure zu dem toxischen Produkt 5'-Fluorouracil umsetzen, können auf FOA-Platten nur solche Hefezellen wachsen, die selbst Uracil auxotroph sind und die ein *URA3*-Gen tragendes Plasmid nicht mehr enthalten. Eine intrazelluläre Anreicherung des toxischen Produktes kann somit nicht entstehen (Boeke *et al.*, 1987).

FOA-Medium: (Rose *et al.*, 1990)

| | | |
|------|---------|---|
| 0,67 | % (w/v) | „Bacto yeast nitrogen base w/o amino acids“ |
| 0,2 | % (w/v) | Dropout Mix“ ohne Uracil |
| 0,45 | mM | Uracil |
| 0,1 | % (w/v) | 5'-Fluoroorotsäure |
| 2 | % (w/v) | Glukose |
| 3 | % (w/v) | Agar |

Die angegebenen Komponenten mit Ausnahme des Agar wurden mit ddH₂O auf ein Volumen von 500 mL aufgefüllt und nach dem Lösen steril filtriert. Separat wurde 3% (w/v) Agar mit ddH₂O auf ein Volumen von 500 mL Wasser eingestellt und anschließend steril autoklaviert. Nach dem Abkühlen der autoklavierten Agarlösung (ca. 80°C) erfolgte die Zugabe der FOA-Lösung in einem Verhältnis von 1:1.

Bestimmung des *MATa/MAT α* Kreuzungstyps:

Zur Bestimmung des *MATa* oder *MAT α* Kreuzungstyps von haploiden Hefe-Stämmen erfolgte das Aufstempeln auf eine mit *MATa* oder *MAT α* Haploiden dicht bewachsene Agarplatte (a- oder α -„lawn“). Nach drei Tagen Inkubation und potentieller Diploidenformation erfolgte das Umstempeln der gewachsenen Kolonien auf B-Agarplatten zur Diploidenselektion. Auf diesen B-Agarplatten können nur solche Kolonien wachsen, die mit dem Stamm des jeweils entgegengesetzten *MAT*-Kreuzungstyps diploide Zellen durch Verpaarung bildeten.

B-Platten: (*MAT α /MATa*-Bestimmung)

| | | |
|------|---------|---|
| 0,67 | % (w/v) | „Bacto yeast nitrogen base w/o amino acids“ |
| 3 | % (w/v) | Agar |

2.8.3 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Für die Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurde eine *E. coli* Übernachtskultur (3.8.1) in 250 mL LB-Medium 1:200 verdünnt und bei 30°C bis zu einer logarithmischen Wachstumsphase von $OD_{600} = 0,5-0,7$ inkubiert. Die Bakterienkultur wurde in sterilen Zentrifugationsbehältern abgefüllt und bei 2500 x g für 10 min und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 80 mL eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und für 10 min auf Eis gehalten. Anschließend wurde die Suspension erneut für 10 min bei 2500 x g und 4°C zentrifugiert. Das resultierende Sediment wurde vorsichtig in 20 mL eiskaltem TB-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von 7% (w/v) DMSO wurden die Zellen erneut für 10 min auf Eis inkubiert. In der Zwischenzeit wurden 1,5 mL Eppendorfgefäße auf 4°C vorgekühlt und für das Aliquotieren vorbereitet. Nach Ende der Inkubationsphase wurde die Zellsuspension zu je 100 μ L in 1,5 mL Reaktionsgefäße abgefüllt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zur längeren Aufbewahrung bei -80°C gelagert.

TB-Puffer (pH 7,0):

| | | |
|-----|----|-------------------|
| 10 | mM | Pipes |
| 55 | mM | MnCl ₂ |
| 250 | mM | KCl |
| 15 | mM | CaCl ₂ |

2.8.4 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente *E. coli* Zellen

Für die Transformation von Plasmid-DNA wurde ein Aliquot chemisch-kompetenter Zellen (100 µL) auf Eis aufgetaut und mit 1 µg Plasmid-DNA oder 5-10 µL eines Ligationsansatzes vorsichtig vermischt. Die Suspension wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Zum Initiieren der Plasmid Aufnahme wurden die Proben für 2 min einem Hitzeschock bei 42°C unterzogen und anschließend sofort mit 800 µL LB-Medium versetzt. Die Zellen wurden für 30-60 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen bei 2500 x g für 1 min bei RT sedimentiert und in 100 µL LB Medium resuspendiert. Mit Hilfe eines sterilen Drigalski-Spatels wurden die Zellen auf selektiven LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.8.5 Selektionsverfahren zur Identifizierung positiver Transformanten

Bei Transformationsverfahren von pGEM-Vektoren in kompetente Zellen wurden mittels des gentechnischen Verfahrens zur Blau-Weiß-Selektion positive Transformanten selektioniert. Für diesen auch als β -Galaktosidase Komplementation bezeichneten Test wurden selektive LB-Agarplatten 1 h vor Gebrauch mit 40 µL 2% (w/v) X-Gal sowie 4 µL 20% (w/v) IPTG behandelt. Durch erfolgreiche Insertion eines DNA-Fragmentes in die multiple Klonierungsstelle („Multiple cloning site „(MCS)) des pGEM T Vektors erfolgte ein Unterbrechen des *lacZ*-Gen Leserasters, so dass eine funktionsfähige β -Galaktosidase nicht mehr gebildet werden konnte. Die betreffenden Kolonien blieben weiß, während bei nicht erfolgter Insertion die exprimierte β -Galaktosidase X-Gal enzymatisch zu Galaktose und den blauen Farbstoff 5-Bromo-4-Chloro-Indol umsetzte, durch den die Kolonien blau gefärbt erschienen.

2.8.6 Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli* Zellen

Plasmid-DNA Isolierungen aus *E. coli* Zellen, die für Restriktionsanalysen, Ligationen und DNA Sequenzierungen notwendig waren, erfolgten entweder über eine Midi-Präparation mit Hilfe des „NucleoBond R PC 100 Midi Plasmid DNA Purification Kit,, (2.3) nach Angaben des Hersteller oder über ein Mini-Präparation in Anlehnung an ein von Birnboim und Doly 1979 verfassten Protokolls. Hierfür wurde Zellmaterial einer *E. coli* Kolonie in 5 mL mit entsprechenden Antibiotika versetztem LB-Medium beimpft und über Nacht inkubiert. Die resultierende stationäre Kultur wurde für 10 min bei 3800 x g bei 4°C pelletiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 100 µL Resuspensionspuffer aufgenommen. Nach Überführen der Suspension in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß erfolgte die Zugabe von 200

µL Lyse-Puffer, welcher durch mehrfaches Invertieren mit der Probe vorsichtig durchmischt wurde. Nach einer 5 minütigen Inkubationsphase bei RT wurde die Probensuspension mit Neutralisationspuffer versetzt und anschließend für 10 min auf Eis inkubiert. In dieser Phase wurden die durch die alkalische Lyse freigesetzten Proteine und die genomische DNA ausgefällt. Das Präzipitat sowie Zelltrümmer wurden bei einer Zentrifugation (10 min, 16100 x g, RT) sedimentiert. Der Überstand wurde in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß übertragen und mit 400 µL einer Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1) versetzt und kräftig gevortext. Zur Phasentrennung schloss sich diesem Schritt eine Zentrifugation für 10 min bei 16100 x g bei RT an. Die wässrige, von Proteinen befreite, aber DNA enthaltende Oberphase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur Fällung der Plasmid-DNA mit 800 µL (v/v) eiskaltem Ethanol versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. In dieser Phase fällt die DNA als Kaliumsalz aus, da die Hydrathülle durch den Alkohol entzogen wird. Zur Präzipitation der Plasmid DNA erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 16100 x g und RT. Das resultierende Pellet wurde luftgetrocknet und anschließend in 50 µL ddH₂O resuspendiert und mit 0,5 µg/µL RNase A behandelt. Die Lagerung der Plasmid DNA erfolgte bei -20°C. Eine Mini-Präparation von Plasmid-DNA mit hohem Reinheitsgrad so wie sie beispielsweise wichtig sind für Sequenzierreaktionen, wurde mit Hilfe des „GenElute™ Plasmid Miniprep kit“ (2.3) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.8.7 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die spektralphotometrische Bestimmung von Nukleinsäuren wurde mittels des NanoDrop™ 1000 Spektrophotometers (2.1) durchgeführt. Nach dem Lambert'schen Gesetz entspricht eine OD₂₆₀ von 1 einer Konzentration von 50 µg/µL doppelsträngiger DNA oder 40 µg/µL RNA (Sambrock *et al.*, 1989). Mögliche Verunreinigungen durch Proteinreste konnten durch eine gemessene Absorption bei 280 nm (Peptidbindungen) ermittelt werden. Der Quotient aus 280/260 nm, der optimal bei 1,8 liegt, gibt die Reinheit der DNA/RNA an.

2.8.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR („Polymerase chain reaction“) Methode wurde eingesetzt, um ausgehend von cDNA oder gDNA Matrizen spezifische DNA Abschnitte unter Verwendung von synthetischen Oligonukleotiden und mittels thermostabiler *Taq* oder *Pfu* Polymerasen *in vitro* zu amplifizieren. Die Oligonukleotide wurden so konstruiert, dass flankierende unikale

Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen dem Amplifikat angefügt und damit eine Ligation in entsprechend linearisierte Vektoren ermöglicht wurde. Für die Amplifikation von ~1 kb großen DNA-Abschnitten wurde in der Regel die DNA-abhängige DNA-Polymerase *Taq* aus *Thermus aquaticus* verwendet, die keine Korrekturlesefunktion besitzt. Die Wahrscheinlichkeit einer spontanen Mutation innerhalb einer Amplifikationsreaktion von 1kb großen DNA Fragmenten beträgt nach Angaben des Herstellers $8,0 \times 10^{-6}\%$ pro Basenpaar. Für die Überprüfung von mutierten gDNA Sequenzen nach EMS-Mutagenese oder für die Klonierung von DNA Produkten >1kb wurde die DNA Polymerase *Turbo Pfu* aus *Pyrococcus furiosus* eingesetzt. Diese Polymerase weist eine zusätzliche 3'-5' Exonuklease-Aktivität und damit eine Korrekturlesefunktion auf (Lundberg *et al.*, 1991). Die Mutationsfrequenz beträgt dann nur noch $1,3 \times 10^{-6}\%$. Die PCR-Reaktionen wurden nach einem Standardreaktionsansatz mit dem Gerät Peltier Thermal Cycler PTC 200 (2.1) i.d.R. nach aufgeführtem Standard PCR-Programm durchgeführt.

Standardreaktionsansatz:

| | |
|-----|--|
| 1 x | <i>Taq</i> -DNA/ <i>Pfu Turbo</i> Polymerase Puffer (10 x) |
| 0,2 | µM dNTP's (10 mM) |
| 0,3 | µM Oligonukleotid 1 |
| 0,3 | µM Oligonukleotid 2 |
| 2,5 | U <i>Taq</i> DNA-Polymerase oder <i>Pfu Turbo</i> DNA Polymerase |
| 100 | ng chromosomale DNA oder 10 ng Plasmid-DNA |

Die Ansätze wurden mit Nuklease freiem ddH₂O auf ein Volumen von 25-100 µL eingestellt.

Standard-PCR-Programm:

| | | | | |
|--------------|---|---------|--------------|------------------------|
| 25-35 Zyklen |  | 95°C | 3 min | Initiale Denaturierung |
| | | 95°C | 45 sec | Denaturierung |
| | | 50-60°C | 45 sec | Hybridisierung |
| | | 72°C | 1 min/kb DNA | Elongation |
| | | 72°C | 10 min | Finale Elongation |

Die PCR Produkte wurden anschließend in 1-2%-igen (w/v) Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt und größenspezifisch mit Hilfe eines DNA Standardmarkers analysiert.

2.8.9 Agarose Gelelektrophorese

Die analytische und präparative Auftrennung der negativ geladenen DNA-Moleküle erfolgte elektrophoretisch der Größe nach in 1-2% igen (w/v) Agarosegelen. Die Laufgeschwindigkeit der nach Restriktionen oder PCR-Reaktionen zu analysierenden DNA Fragmente ist im elektrischen Feld umgekehrt proportional zum Ladungs-Massen-Verhältnis der Nukleinsäuren. Die durch Kochen in 1 x TAE-Puffer gelöste Agarose wurde nach dem Abkühlen auf ~50°C mit 0,5 µg/mL Ethidiumbromid versetzt und in horizontale Gelkammern (10 cm x 10 cm x 1 cm) gegossen. Nach dem Erstarren des Agarosegels wurden die zuvor eingesetzten Taschenformer für die Proben entfernt und das Gel in einer Laufkammer mit 1 x TAE-Puffer bedeckt. Die Nukleinsäureproben wurden vor dem Auftragen in die Geltaschen mit 6 x Probenpuffer versetzt. Zur Bestimmung der Größe von DNA-Fragmenten wurden zusätzlich die Standardmarker „ λ /EcoRI Ladder“ (Fermentas) oder „1 kb DNA Ladder“ (NEB) auf das Gel MIT aufgetragen. Mit einer angelegten Spannung von 120 V wurden die Elektrophoresen durchgeführt. Die Visualisierung der DNA-Fragmente erfolgte mittels des in die DNA interkalierenden Agens Ethidiumbromid unter UV-Licht (320 nm) des Transilluminators (3.1).

1 x TAE-Puffer:

| | | |
|-----|---------|------------|
| 40 | mM | Tris/HCl |
| 0,1 | % (v/v) | Essigsäure |
| 1 | mM | EDTA |

6 x Probenpuffer (pH 7,0):

| | | |
|------|---------|--------------------------------|
| 25 | % (w/v) | Ficoll 400 |
| 0,25 | % (w/v) | Bromphenolblau |
| 0,25 | % (w/v) | Xylencyanol |
| 3 | mM | Na ₂ -EDTA (pH 8,0) |

2.8.10 Elution von DNA aus Agarosegelen

Elektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht Visualisierung mit Hilfe eines Skalpells als Gelstück ausgeschnitten. Die DNA aus ausgeschnittenden Agarosegelstücken oder aus PCR-Reaktionslösungen wurden mit Hilfe des „NucleoSpin® Extract 2 in 1 Kit“ (2.3) nach Angaben des Herstellerprotokolls extrahiert und aufgereinigt.

2.8.11 Sequenzspezifische enzymatische DNA-Hydrolyse durch Restriktionsendonukleasen

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen konnte doppelsträngige DNA an spezifischen Erkennungssequenzen aufgebrochen werden, wobei Fragmente mit sog. klebrigen Enden („sticky ends“) erzeugt wurden. Die Restriktion wurde für die Analyse von Klonierungsschritten oder als Vorbereitung für die Ligation in Zielvektoren angewandt und nach Angaben des Herstellers (MBI Fermentas, St Leon Roth/Deutschland; New England Biolabs, Beverly/USA) durchgeführt.

Standardansatz 20 µL:

| | |
|-----|------------------------------|
| 1 | µg DNA |
| 2 | µL Restriktionspuffer (10 x) |
| 1-5 | U Restriktionsendonuklasen |

Der Ansatz wurde mit Nuklease-freiem ddH₂O auf ein Volumen von 20 µL aufgefüllt. Die Restriktionsansätze wurden bei 37°C für 1-2 h oder über Nacht inkubiert.

2.8.12 Dephosphorylierung von 5'-DNA Fragment-Enden

Um eine mögliche Religation von linearisierter Plasmid-DNA nach Restriktion zu verhindern, erfolgte eine Dephosphorylierung der 5' Enden durch Behandlung mit 1 U alkalischer Phosphatase (CIAP) (2.4) nach Angaben des Herstellers. Der Ansatz wurde bei 37°C für 1 h inkubiert. Anschließend wurde die alkalische Phosphatase durch Erhitzen für 15 min bei 85°C inaktiviert.

2.8.13 Ligation von DNA-Fragmenten

Die kovalente Verknüpfung von restringierter Zielvektor-DNA und Fragment-DNA erfolgte mit Hilfe der T4-Ligase (2.4). Die T4-Ligase bildet Phosphodiesterbindungen sowohl zwischen kompatiblen kohäsiven als auch glatten Enden aus. In jedem Ligationsansatz wurde die Vektor-DNA zu einer Endkonzentration von 100 ng eingesetzt. Die Konzentration des zu inserierenden DNA-Fragments berechnete sich aus folgender Formel:

$$\frac{\text{Menge des Plasmids [ng]} \times \text{Größe des Fragments [kb]}}{\text{Größe des Plasmids [kb]}} \times \text{molares Verhältnis} \times \frac{\text{Fragment}}{\text{Plasmid}} = \text{Menge des Fragments}$$

Standardmäßig wurde ein molares Verhältnis von 2:1 in der Formelberechnung berücksichtigt. Als Kontrollansätze wurde anstelle der angegebenen Menge an Vektor-DNA ddH₂O pipettiert und zum anderen wurde die Fragment-DNA gegen ein äquivalentes Mengenvolumen ddH₂O im Ansatz ausgetauscht. Der Ligationsansätze wurden über Nacht bei 16°C oder für 2-8 h bei 25°C inkubiert. Anschließend konnte eine Transformation in kompetente *E. coli* Zellen erfolgen. Der Ansatz wurde auf selektiven LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert (siehe 2.8.4). Die Anzahl der auf den Negativkontrollansätzen gewachsenen Kolonien wurden ins Verhältnis zur Kolonienanzahl des Positivansatzes gesetzt und lieferte so Aussagen über Wahrscheinlichkeitsraten von Religationen und unzureichender DNA Restriktion. Für Ligationsansätze mit dem „pGEM®-T Vector kit“ (2.3) wurde folgender Ansatz nach Angaben des Herstellers pipettiert.

Standardansatz (10 µL):

| | | |
|---|----|-----------------------------|
| 5 | µL | 2 x Ligationspuffer |
| 1 | µL | pGEM-T-Easy Vektor (100 ng) |
| 3 | µL | PCR-Produkt |
| 1 | µL | T4-DNA-Ligase |

2.8.14 Klonierung von PCR Fragmenten in pGEM®-T

Die effiziente Ligation von *Taq*-DNA Polymerase generierten PCR Produkten erfolgte mit Hilfe des pGEM®-T Vector kit Systems (2.3) nach Angaben des Herstellers. Bei der PCR-Reaktion wird durch eine Matrizen unabhängige Transferaseaktivität der *Taq* DNA Polymerase in 50% der Fälle ein einzelnes 3' Desoxy-Adenosin an das PCR-Amplifikat angehängt, während der linearisierte pGEM®-T Vektor 3'-terminales Thymidin an beiden Enden aufweist. Somit werden über kompatible Überhänge die Ligation des PCR-Produktes in den Klonierungsvektor erleichtert. Nach der *E. coli* Transformation können resultierende Kolonien nach einem β-Galaktosidase Komplementations-Test auf PCR-Produkt Integration getestet werden (siehe 2.8.5).

2.9 Experimentelles Arbeiten mit *S. cerevisiae*

2.9.1 Hocheffiziente Transformation von Plasmid DNA (Gietz *et al.*, 1992)

Eine Einzelkolonie des verwendeten Hefestammes wurde in 5 mL YPD oder Selektiv-Flüssigmedium über Nacht angeimpft. Die resultierende stationäre Hefekultur wurde auf eine Zellzahl von $0,5 \times 10^7$ Zellen/mL in 5 mL neuem Medium verdünnt und standardmäßig bei 25°C im Kulturröhrchen-Rotator inkubiert. Bei Erreichen einer Zellzahldichte von $1-3 \times 10^7$ Zellen/mL, welche einer logarithmischen Wachstumsphase entspricht, erfolgte die Sedimentation der Zellen für 5 min bei 2500 x g und RT. Das Pellet wurde anschließend in 1 mL ddH₂O aufgenommen. Die Probensuspension wurde in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und für 1 min bei 16100 x g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 1 mL TE/Lithiumacetat gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (1 min, 16100 x g, RT) wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet mit TE/Lithiumacetat auf eine Zelldichte von 1×10^9 Zellen/mL eingestellt. 50 µL dieser Probensuspension wurden mit 1 µg Plasmid-DNA und 50 µg hitzedenaturierter Lachs Sperma-Träger-DNA (ssDNA) versetzt und gemischt. Für die Permeabilisierung von Zellwand und Membran erfolgte die Zugabe von 300 µL PEG/TE/Lithiumacetat, an die sich eine Inkubationsphase für 30 min bei 25°C unter vorsichtigem Schwenken anschloss. Es folgte ein Hitzeschock für 15 min bei 42°C. In dieser Zeit erfolgt die Plasmid-DNA Aufnahme. Nach diesem Hitzeschock wurden die Zellen als Pellet durch Zentrifugation (16100 x g, 1 min, RT) gesammelt und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden mit 1 mL ddH₂O gewaschen und nach erneuter Zentrifugation (16100 x g, 1 min, RT) in 100 µL ddH₂O resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit Hilfe eines sterilen Drigalski-Spatels auf selektiven Festmediumplatten ausplattiert und standardmäßig für 4 Tage bei 25°C inkubiert. Jeweils 4-6 der gewachsenen Klone aus dem Transformationsansatz wurden steril auf eine neue Festmediumsplatte mittels Vermehrungsausstrich übertragen.

TE/Lithiumacetat, (pH7,5):

| | | |
|-----|----|---------------|
| 100 | mM | Lithiumacetat |
| 10 | mM | Tris/HCl |
| 1 | mM | EDTA |

PEG/TE/Lithiumacetat, (pH7,5):

| | | |
|-----|---------|------------------------------|
| 40 | % (w/v) | Polyethylenglykol (PEG) 4000 |
| 100 | mM | Lithiumacetat |
| 10 | mM | Tris/HCl |
| 1 | mM | EDTA |

2.9.2 Extraktion von Plasmid-DNA

Für die Isolierung von Plasmiden aus Hefezellen wurde eine stationäre Kultur ($1-3 \times 10^8$ Zellen/mL) durch Zentrifugation sedimentiert ($2500 \times g$, 5 min, RT). Nach Verwerfen des Überstandes erfolgte die Resuspension in 1 mL ddH₂O und ein Überführen der Probe in ein 2 mL Reaktionsgefäß mit Schraubverschluss. Die Hefezellen wurden bei $16100 \times g$ für 1 min bei RT zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 300 µL „Cracking“-Puffer, 300 µL Glasperlen und 400 µL Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und in der Fastprep® 24-Maschine (2.1) kräftig gevortext (4 m/sec, 20 sec). Für die Phasentrennung erfolgte eine Zentrifugation bei $16100 \times g$ für 10 min bei RT. Die obere, Plasmid-DNA enthaltende Phase wurde in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß übertragen und mit 1 mL 100% (v/v) Ethanol versetzt und vorsichtig invertiert. Es folgte eine Inkubationsphase für 1 h bei -20°C. Die präzipitierte DNA wurde nach Zentrifugation mit 1 mL 70% (v/v) Ethanol gewaschen bevor das Präzipitat bei RT luftgetrocknet wurde. Schließlich erfolgte die Resuspension der Plasmid-DNA in 50 µL ddH₂O.

„Cracking“-Puffer:

| | | |
|-----|---------|--------------------------------|
| 2 | % (v/v) | Triton X-100 |
| 1 | % (w/v) | SDS |
| 0,2 | M | NaCl |
| 10 | mM | Tris/HCl (pH 7,5) |
| 1 | mM | Na ₂ -EDTA (pH 8,0) |

2.9.3 Wachstumsanalyse von *S. cerevisiae*

Für eine vergleichende Wachstumsanalyse verschiedener Hefe-Stämme wurde eine serielle Verdünnungsreihe aus seriellen Hefezellzahlen angesetzt. Ausgehend von einer maximalen Zellzahl von 10^7 Zellen/mL erfolgte die Herstellung weiterer Ansätze in 1:10 Verdünnungsschritten bis zu 10^3 Zellen/mL. Jeweils 10 μ L dieser Verdünnungsansätze (10^5 - 10^1 Zellen) wurde auf entsprechende Festmediumsplatten getropft und für 3 Tage bei entsprechender Temperatur inkubiert.

2.9.4 Isolierung von genomischer DNA (gDNA)

10 mL einer stationären *S. cerevisiae* Flüssigkultur ($1-3 \times 10^8$ Zellen/mL) wurden bei 2500 x g für 5 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 1 mL ddH₂O resuspendiert und in ein 2 mL Reaktionsgefäß mit Schraubdeckelverschluß überführt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (16100 x g, 1 min, RT) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in „Detergent-Lysis“-Puffer aufgenommen und gevortext. Nach der Zugabe von 300 μ L Glasperlen und 200 μ L Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) erfolgte der mechanische Zellaufschluß in der Fastprep®24 Maschine bei 4m/sec für 20 sec. Die Proben wurden anschließend mit 200 μ L TE-Puffer versetzt und kurz gevortext. Durch Zentrifugation bei 16100 x g für 5 min bei RT erfolgte die Phasentrennung, wobei die wässrige Oberphase abgenommen und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt wurde. Durch Zugabe von 1 mL 100% (v/v) Ethanol und 6 μ L 7,5 M Ammoniumacetat erfolgte die effektive Präzipitation während einer Inkubationsphase von 30 min und -20°C. Nach anschließender Zentrifugation (16100 x g, 10 min, 4°C) wurde das Präzipitat mit 1 mL 70% (v/v) Ethanol gewaschen und nach erneuter Zentrifugation (16100 x g, 5 min, 4°C) bei RT luftgetrocknet. Das gDNA Präzipitat wurde in 50-100 μ L TE-Puffer resuspendiert und bei -20°C gelagert.

„Detergent-Lysis“-Puffer:

| | | |
|-----|---------|--------------------------------|
| 2 | % (v/v) | Triton X-100 |
| 1 | % (w/v) | SDS |
| 0,1 | M | NaCl |
| 10 | mM | Tris/HCl (pH 7,5) |
| 1 | mM | Na ₂ -EDTA (pH 7,5) |

TE-Puffer:

| | | |
|-----|----|--------------------------------|
| 100 | Mm | Tris/HCl |
| 10 | mM | Na ₂ -EDTA (pH 7,5) |

2.9.5 Isolierung von Gesamt-RNA

Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurde in der Regel das Reaktionssystem „RNeasy Mini-Kit“ (2.3) verwendet und nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wurde das Protokoll für die mechanische Hefe-Zellaufschlußmethode sowie die optionale Säulen-gekoppelte DNase I Behandlung angewendet. Alternativ erfolgte die Extraktion von Gesamt-RNA nach der optimierten Guanidinisothiocyanat-Phenol-Methode mit Hilfe des Reagenz „PeqGold RNA Pure™“ (2.2) nach Arbeitsanleitung des Herstellers. Die Elution der präzipitierten RNA erfolgte dabei in 30 µL DEPC behandeltem ddH₂O (0,1% (v/v)). Das alkylierend wirkende DEPC wird zur chemischen irreversiblen Inaktivierung von Ribonukleinsäuren verwendet.

2.9.6 Sporulation und TetradendisektionHaploiden-Kreuzung und Sporulation:

Haploide Hefezellen kommen in den zwei Paarungstypen („mating type“) *MATa* und *MATα* vor. Diese entgegengesetzten Zelltypen können durch Plasmogamie zur Zygote miteinander fusionieren. Dort kommt es zu einer Vereinigung der Zellkerne (Karyogamie) und nach der Reifeteilung (Verdopplung der 2n Chromosomensätze auf 4n) werden die vier Chromosomensätze durch zwei meiotische Teilungsschritte auf vier haploide Sporen (Tetrade), die in einem Ascus organisiert sind, verteilt. Tetradensporen können durch die Tetradendisektion voneinander getrennt und genotypisiert werden.

Für die Kreuzung wurden zwei haploide *S. cerevisiae* Stämme, die entgegengesetzten Kreuzungstypen angehören zu einem diploiden Stamm auf YPD Agarmedium miteinander verstrichen und für 2-3 Tage bei 25°C inkubiert. Gebildete Diploide, die über eine Markerselektion auf entsprechenden Mangelmedium Platten selektioniert werden können, wurden durch Übertragen der Zellen in Sporulationsmedium (2.8.2) zur Sporenbildung bei 25°C angeregt. Nach 3-4 Tagen Inkubationszeit erfolgte die Kontrolle der Ascibildung im Lichtmikroskop.

Tetradendissektion:

Für die Zergliederung der Sporen aus den Tetraden wurden 50 µL der Sporulationskultur in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und bei 16100 x g für 1 min bei RT sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µL ddH₂O gewaschen mit einer anschließender Zentrifugation bei 16100 x g für 1 min bei RT. Die sedimentierten Zellen wurden nun in 50 µL P-Lösung vorsichtig resuspendiert und mit 0,5 U Zymolase (3.4) versetzt. In der sich anschließenden Inkubationsphase für etwa 6-10 min erfolgte ein enzymatische Verdau der Ascuswand, die das Freisetzen der Sporen erleichtert. Es folgte die Zentrifugation der Zellen bei 16100 x g für 1 min bei RT. Die Zellen wurden mit 100 µL P-Lösung gewaschen, erneut zentrifugiert und in 200 µL P-Lösung resuspendiert. Es erfolgte eine Verdünnung der Zellsuspension im Verhältnis 1:40 oder 1:20 in 100 µL ddH₂O. Diese ädaquat verdünnte Suspension wurde auf ein Drittel der YPD-Agarplatte verteilt. Die YPD-Platte wurde in das Tetradenmikroskop eingespannt. Mit Hilfe einer Mikronadel (Schuett Biotec), die über einen am Mikroskop angelegten Mikromanipulator bewegt werden konnte, erfolgte die Vereinzelung der Sporen. Die jeweils vier Sporen einer Tetrade wurden dabei mit Hilfe eines angebrachten Koordinatensystems auf der Agarplatte geordnet abgelegt. Nach 3-4 Tagen Inkubation der Sporen und anschließendem Vermehrungsausstrich bei 25°C wurden die Sporen genotypisiert und in Mikrotiterplatten als Glyzerindauerkultur angelegt.

P-Lösung (pH 6,5):

| | | |
|-----|----|---------------------------------|
| 33 | mM | K ₂ HPO ₄ |
| 67 | mM | KH ₂ PO ₄ |
| 1,2 | M | Sorbitol |

2.10 Protein-biochemische und zellbiologische Methoden

2.10.1 Ko-Immunopräzipitation

Für die Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen wurde ein getaggttes Protein, dass für die Präzipitation vorgesehen ist und sein Interaktionspartner aus einem Proteingemisch durch einen spezifischen Antikörper gebunden. Verwendete Protein G-Sepharose- oder Protein-G Plus Agarose-Kügelchen („Beads“) wiederum binden mit hoher Spezifität die Fc-Region des Antikörper-Protein-Komplexes. Wurde in der Ko-Immunopräzipitation ein TAP getaggttes Protein präzipitiert, so erfolgte die spezifische Bindung von Protein A, einem

Bestandteil des TAP-tags mit Hilfe von IgG-„Beads“. Nach Herstellung einer stationären *S. cerevisiae* Kultur wurde diese auf eine Zelldichte von $0,5 \times 10^7$ Zellen/mL in 400 μ L YPD-Vollmedium oder zur Plasmidselektion in SD-Mangelmedium verdünnt. Die Kultur wurde bei 25°C bis zum Erreichen eines logarithmischen Wachstums von $2-3 \times 10^7$ Zellen/mL inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei einer Zentrifugation von $2500 \times g$ für 5 min bei 4°C geerntet. Das Zellpellet wurde mit 20 mL ddH₂O gewaschen und nach dem erneuten Pelletieren in 2 mL PBSKMT-Puffer resuspendiert und auf zwei 2 mL Reaktionsgefäße mit Schraubdeckelverschluß gleichmäßig verteilt. Nach der Sedimentation der Zellen ($16100 \times g$, 1 min, 4°C) und dem Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren oder direkt weiter behandelt. Um einen Proteinabbau zu vermeiden, erfolgte die sofortige Zugabe von 7,5 μ L Proteasen-Inhibitoren von Roche Nr. 11873580001 und Sigma P8215 pro 150 μ L Zellpellet. Ein zum Pellet äquivalentes Volumen an Glaskügelchen und zwei Pelletvolumen PBSKMT-Puffer wurden ebenfalls zugegeben, bevor die Zellyse in der FastPrep[®]24-Maschine bei einer Geschwindigkeit von 4m/sec für 20 sec durchgeführt wurde. Nach dem Zentrifugieren bei $16100 \times g$ für 5 min bei 4°C wurde das Lysat als klarer Überstand abgenommen und in zwei Portionen gleichen Volumens aufgeteilt. Diese beiden Fraktionen wurden ohne und nach Zugabe von 200 μ g/mL RNase A in der Ko-Immunopräzipitation eingesetzt. Zunächst wurde das Lysat für 1 h mit dem entsprechenden Antikörper bei 4°C auf einem Drehrad rotierend inkubiert. Anschließend erfolgte die Kopplung des Antikörper-Fusionprotein Komplexes an zuvor mit PBSKMT-Puffer äquilibrierte G-Sepharose- (10 μ L), Protein G Plus Agarose- (20 μ L) oder IgG-„Beads“ (10 μ L) für 4 h bei 4°C. Die „Beads“ wurden anschließend mit je 1 mL PBSKMT-Puffer fünfmal gewaschen und bei $2000 \times g$ für 2 min, und 4°C zentrifugiert. Die „Beads“ wurden schließlich in 30 μ L SDS-Probenpuffer aufgenommen. Ebenfalls wurden 30 μ L Lysatprobe und 30 μ L des letzten Waschschrilles mit SDS-Probenpuffer versetzt und schockgefroren oder direkt nach Erhitzen der Proben bei 95°C für 5 min für die SDS-PAGE Gelelektrophorese vorbereitet.

PBSKMT-Puffer (pH 8,0):

| | | |
|-----|---------|----------------------------------|
| 150 | mM | NaCl |
| 35 | mM | KCl |
| 15 | mM | Na ₂ HPO ₄ |
| 1 | mM | KH ₂ PO ₄ |
| 3 | mM | KCl |
| 2,5 | mM | MgCl ₂ |
| 0,1 | % (v/v) | Triton X-100 |

2.10.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli (1970) durchgeführt. Die Elektrophoresen wurden in den laboreigenen Gelsystemen mit den Plattengrößen 12 cm x 18 cm oder 18 cm x 20 cm, die in einem Abstand von 1 mm oder 2 mm zueinander eingespannt wurden, durchgeführt. Je nach Molekulargewicht der zu analysierenden Proteine wurden Trenngele von 8-11% oder Gradientengele (6%/9%/12%) gegossen. Nach dem Gießen des Trenngels wurde die Oberfläche zum Erzeugen einer planaren Linie mit 100% (v/v) Isopropanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des Gels und dem Entfernen des Isopropanols durch mehrmaliges Spülen mit ddH₂O erfolgte das Gießen des 5%-igen Sammelgels in das zugleich ein Taschenformer für das spätere Auftragen der Proben gesetzt wurde. Die aufzutragenden Proben wurden zuvor in SDS Probenpuffer aufgenommen, durch Erhitzen bei 95°C denaturiert und zusammen mit dem PAGE Ruler™ „Prestained Protein Ladder“ oder PAGE Ruler™ „Unstained Protein Ladder“ als Molekulargewichtsstandard auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Elektrophoresen wurden in vertikalen Gelkammervorrichtungen bei einer konstanten Spannung von 35 mA pro Gel durchgeführt, wobei der Elektrophoresepuffer zugleich als Anoden- und Katodenpuffer Verwendung fand.

Trenngel (11%, pH 8,8):

| | | |
|------|----|-------------------------------------|
| 9,05 | mL | H ₂ O |
| 9,15 | mL | 30% Bisacrylamid/Acrylamid (37,5:1) |
| 6,3 | mL | 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 |
| 250 | µL | 10% (w/v) SDS |
| 250 | µL | 10% (w/v) Ammoniumpersulfat (APS) |
| 10 | µL | TEMED |

Sammelgel (5%):

| | | |
|-----|----|-------------------------------------|
| 2,7 | mL | H ₂ O |
| 670 | µL | 30% Bisacrylamid/Acrylamid (37,5:1) |
| 500 | µL | 1 M Tris/HCl, pH 6,8 |
| 40 | µL | 10% (w/v) SDS |
| 40 | µL | 10% (w/v) Ammoniumpersulfat (APS) |
| 4 | µL | TEMED |

SDS-Elektrophoresepuffer:

| | | |
|------|---------|-------------------|
| 25 | mM | Tris/HCl (pH 6,8) |
| 192 | mM | Glyzin |
| 0,15 | % (w/v) | SDS |

1 x SDS-Probenpuffer:

| | | |
|-------|---------|-------------------|
| 62,5 | Mm | Tris/HCl (pH 6,8) |
| 10 | % (v/v) | Glycerin |
| 0,15 | % (w/v) | SDS |
| 5 | % (v/v) | 2-Mercaptoethanol |
| 0,001 | % (w/v) | Bromphenolblau |

2.10.3 Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf Membranen (Semi-Dry-Western Blot)

In Vorbereitung für das Western Blot Verfahren wurden vier Lagen auf Gelgröße zugeschnittenes Filterpapier, eine Nitrozellulose-Membran und das SDS-Gel für etwa 1 min in Transferpuffer äquilibriert. Anschließend wurde der „Blot“ luftblasenfrei in einer Semi-Dry Blot Apparatur (2.1) auf der Anodenseite aufgebaut. Der Proteintransfer von dem SDS-Gel auf die Membran erfolgte bei einer konstanten Spannung von 200 mA ($1,8 \text{ mA pro cm}^2$) für 1,5 h. Für eine Kontrolle der Transfereffizienz wurde die Nitrocellulose-Membran für 1 min mit Ponceau-S-Lösung (0,1% (w/v) Ponceau-S, 5% (v/v) Essigsäure) angefärbt. Nach dem Sichtbarwerden der angefärbten Proteinmarkerbanden und Proteinbanden der Proben wurde der Farbstoff mit ddH₂O von der Membran wieder entfernt. Zur Unterbindung einer unspezifischen Antikörperbindung wurde die Membran in Blockierungslösung für 1 h inkubiert.

Western Blot-Transfer Puffer:

| | | |
|-----|-------|-------------------|
| 25 | mM | Tris/HCl (pH 6,8) |
| 192 | mM | Glyzin |
| 20% | (v/v) | Methanol |

Immunologischer Protein-Nachweis:

Die Bindung des Protein-spezifischen Primärantikörpers, der in TBS-T-Puffer und 2% (v/w) Milchpuffer entsprechend verdünnt auf die Membran gegeben wurde, erfolgte über Nacht bei 4°C unter vorsichtigem Schwenken. Anschließend wurde nach dreimaligem Waschen mit TBS-T-Puffer (je 15 min) die Membran mit Meerrettich-Peroxidase konjugiertem Anti-Rabbit oder Anti-Maus IgG-Antikörpern in TBS-T, 2% Milchpulver (w/v) 1:20000 verdünnt für 4 h oder über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Membran erneut dreimal mit TBS-T-Puffer gewaschen, wobei ein letztes Reinigen der Membran in TBS-Puffer für 5 min erfolgte. Peroxidase konjugierte Antikörper katalysieren die Oxidation von Luminol, welche mit einer Chemilumineszenz einhergeht. Für die Immunodetektion wurde daher die Membran für 1 min in ECL-Lösung inkubiert und das entstehende Signal mit einem Röntgenfilm (X-ray FUJIFilm) aufgenommen, der im Röntgenfilmentwickler X-OMAT 2000 Prozessor (2.1) entwickelt wurde.

TBS-Puffer (pH 7,2):

| | | |
|-----|----|----------|
| 20 | mM | Tris/HCl |
| 0,5 | M | NaCl |

TBS -T-Puffer (pH7,2):

| | | |
|-----|---------|----------|
| 20 | mM | Tris/HCl |
| 0,5 | M | NaCl |
| 0,1 | % (v/v) | Tween |

Blockierungslösung:

| | | |
|---|---------|--------------------------------------|
| 5 | % (w/v) | Milchpuffer in TBS-T Puffer verdünnt |
|---|---------|--------------------------------------|

ECL-Lösungen:

| | | | |
|-----------|------|---------|--------------------------------|
| Lösung A: | 0,1 | M | Tris (pH 8,5) |
| | 2,5 | mM | Luminol (Stock 250 mM Luminol) |
| | 0,4 | mM | p-Cumarsäure |
| Lösung B: | 0,1 | M | Tris/HCl (pH 8,5) |
| | 0,03 | % (v/v) | H ₂ O |

2.10.4 Mikroskopische Lokalisationsstudien von GFP-Fusionsproteinen

Für intrazelluläre Lokalisationsstudien von GFP-getaggten Proteinen wurden zunächst 5 mL einer logarithmischen Wachstumskultur ($1-3 \times 10^7$ Zellen/mL) hergestellt. In der Regel erfolgte in diesen Experimenten die Verwendung von Temperatur-sensitiven (ts)-Mutanten, so dass zusätzlich eine Inkubation bei der restriktiven Temperatur von 37°C durchgeführt wurde. Für die Fixierung des GFP-Protein Lokalisationszustandes erfolgte die Zugabe von 350 µL 37% Formaldehyd. Die auf diese Weise chemisch fixierten Zellen wurden durch Zentrifugation bei 2500 x g für 5 min bei RT sedimentiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes erfolgte ein zweimaliges Waschen des Zellpellets mit 1 mL Phosphatpuffer und ein einmaliges Waschen mit 1 mL P-Lösung. Schließlich wurden 1×10^7 fixierte Zellen/mL in 100 µL P-Lösung resuspendiert. Für die GFP-Mikroskopie wurden spezielle Teflon-beschichtete Objektträger (Kobe, Marburg/Deutschland) verwendet, die 12 kreisförmige Aussparungen für das Auftragen verschiedener Zellproben aufwiesen. Die Aussparungen wurden vor dem Auftragen der Proben mit 0,3% (w/v) Polylysin behandelt. Nach einer 5-minütigen Inkubation wurde überschüssige Polylysin-Lösung durch kurzes Spülen mit ddH₂O entfernt und der Objektträger für ca. 30 min luftgetrocknet. Durch diese Behandlung wurde eine polykationische Oberfläche geschaffen, die eine Adhäsion der negativ geladenen Hefezell-matrix ermöglicht. Je 25 µL der Zellsuspensionen wurden pro Aussparung auf den Objektträger getropft und für 15 min bei RT unter Lichtausschluß inkubiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und es folgte eine Behandlung der Zellen mit je 25 µL frisch angesetztem 0,5% (v/v) Triton-X-100 verdünnt in P-Lösung für 5 min bei RT, um eine Permeabilisierung der Zellmembran zu bewirken. Anschließend wurden die Zellen zum einen mit P-Lösung und zum anderen mit „Aby-wash II“ gewaschen. Für eine zusätzliche *in situ* Färbung von DNA wurden die Zellen für 3 min mit 30 µM DAPI (30 µM in Aby Wash II) inkubiert. Danach wurde überschüssiger Farbstoff durch dreimaliges Waschen mit „Aby Wash II“ entfernt. Die behandelten Objektträger wurden anschließend an der Luft unter Lichtausschluß getrocknet. Schließlich wurde der Objektträger mit „Anti-fading“-Reagenz beschichtet und mit einem Deckgläschen luftdicht verschlossen.

Die mikroskopischen Aufnahmen zur Lokalisationsbestimmung von GFP-Fusionsproteinen erfolgte mit Hilfe des Leitz Aristoplan oder Leica AF6000-Fluoreszenz-Mikroskops. Die digitalen Bildaufnahmen erfolgten mit der ORCA C4742-95 Kamera und den Computerprogrammen HPD-CP Version 2.6.2.0 (Leitz) oder LAS/AF (Leica). In der Regel wurden die Aufnahmen bei einer Objektiv Vergrößerung von 63 x 1000 durchgeführt.

Phosphatpuffer (pH 6,5):

| | | |
|----|----|---------------------------------|
| 33 | mM | K ₂ HPO ₄ |
| 67 | mM | KH ₂ PO ₄ |

P-Lösung (pH 6,5):

| | | |
|-----|----|---------------------------------|
| 33 | mM | K ₂ HPO ₄ |
| 67 | mM | KH ₂ PO ₄ |
| 1,2 | M | Sorbitol |

„Aby-wash II“ (pH 9,5):

| | | |
|-----|---|----------|
| 0,1 | M | Tris/HCl |
| 0,1 | M | NaCl |

„Anti-Fading“- Reagenz (pH 8,0):

| | | |
|-----|---------|----------------------------------|
| 2 | % (w/v) | N-Propyl-Gallat |
| 80 | % (v/v) | Glyzerin |
| 0,5 | mM | KCl |
| 1,5 | mM | Na ₂ HPO ₄ |
| 0,4 | mM | KH ₂ PO ₄ |

2.10.5 GFP-Fluoreszenz-Messungen

S. cerevisiae-Stämme, die mit Plasmid kodierten GFP-Reportergenen transformiert worden waren, wurden bis zu einer logarithmischen Wachstumsphase von 2×10^7 Zellen/mL angezogen und anschließend für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden bei 2500 x g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entnommen und verworfen. Anschließend wurde das Pellet in 3 mL 1 x PBS aufgenommen und resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine Quarzküvette überführt und im Fluoreszenz-Spektrometer Jasco TP 6300 (2.1) analysiert. Die Aufnahmen der Fluorophor Emissionspektren erfolgten bei einer Exzitationswellenlänge von 480 nm. Mit Hilfe des Programmes Spectra Manager™ (Jasco®) wurden die Hintergrundwerte über die „Autozero“ Funktion subtrahiert und die

Messungen gestartet. Der jeweilige GFP-Fluoreszenzintensitäts-Höchstwert wurde mit Hilfe des entsprechenden Programmes bei einer Wellenlänge von 512 nm analysiert.

1 x PBS (pH 8,0):

| | | |
|-----|----|----------------------------------|
| 150 | mM | NaCl |
| 35 | mM | KCl |
| 15 | mM | Na ₂ HPO ₄ |
| 1 | mM | KH ₂ PO ₄ |

2.10.6 β -Galaktosidase Aktivitätsmessungen von Reporterkonstrukten

Für diese Experimente wurden Plasmid-kodierte Hybridkonstrukte verwendet. Diese enthielten einen Galaktose induzierbaren Promoter (*GAL1*), eine „upstream activator“ Sequenz (UAS) in Verbindung mit einer *CYC1* Startsequenz, die zusätzlich eine kontrollierte Expressionsverstärkung ermöglichte. Die *CYC1* Sequenz wurde als Hybridkonstrukt vor das *lacZ* Gen geschaltet, welches für die β -Galaktosidase kodiert. In einem zweiten Plasmid-kodierten *lacZ*-Hybridkonstrukt ist zusätzlich ein synthetisches Intron inseriert worden, um Spleißineffizienzen zu analysieren. Für die Analyse exprimierter β -Galaktosidase wurden die Stämme mit beiden Konstrukten jeweils transformiert. Im Experiment verwendete Zellen logarithmischer Wachstumsphase ($OD_{600} = 0,5-0,8$) wurden für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend bei 2500 x g für 5 min und 4°C pellettiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 mL eiskaltem Z-Puffer aufgenommen. Die Suspension wurde in 2 mL Reaktionsgefäße überführt und bei 16100 x g für 1 min zentrifugiert. Unter erneuter Verwendung des Z-Puffers wurden die Zellen gewaschen und wie zuvor zentrifugiert. Die Zellen wurden nun in 300 μ L Z-Puffer aufgenommen. Für die Zelllyse wurde die Zellsuspension in flüssigem Stickstoff für 30 sec schockgefroren und anschließend für 90 sec bei 37°C wieder aufgetaut. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt. Je 700 μ L Z-Puffer wurden mit 0,35 M β -Mercaptoethanol versetzt und dem Zelllysats beigefügt. Unmittelbar danach erfolgte die Zugabe von in 160 μ L Z-Puffer gelöstem 0,015 M o-Nitro-phenyl- β -D-Galactopyranosid (ONPG). Es folgte eine Inkubation des Reaktionsansatzes bei 37°C. ONPG ist ein synthetisches Substrat der β -Galaktosidase, die dieses zu Nitrophenol umsetzt. Nitrophenol zeichnet sich durch seine gelbliche Färbung aus, deren Absorption bei einer optischen Dichte (OD) von 420 nm spektralphotometrisch gemessen werden kann. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 400 μ L 1 M Na₂CO₃ gestoppt. Nach dem Zentrifugieren

der Zellsuspension bei 16100 x g für 5 min wurde der Überstand abgenommen und bei einer OD von 420 nm gemessen. Als Referenzwert diente ein Ansatz mit den verwendeten Lösungen ohne Hefezellen. Die β -Galaktosidase Aktivität errechnet sich aus folgender Formel unter Berücksichtigung der jeweiligen Inkubationszeit [min] und des im Experiment verwendeten Lysatvolumens [mL]:

$$\beta\text{-Galaktosidase Aktivität [Units]} = \frac{1000 \times \text{OD}_{420}}{\text{Zeit [min]} \times \text{Volumen [ml]} \times \text{OD}_{600}}$$

Z-Puffer (pH 7,0):

| | | |
|-----|----|--------------------------------|
| 100 | mM | Natriumphosphat-Puffer, pH 7,0 |
| 10 | mM | KCl |
| 1 | mM | MgSO ₄ |

2.11 RNA-biologische Methoden

2.11.1 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) von mRNA (modifiziert nach Amberg *et al.*, 1992)

Für die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung wurden 5 mL einer *S. cerevisiae* Kultur ($1-3 \times 10^7$ Zellen/mL) durch Zugabe von 350 μ L Formaldehyd chemisch fixiert und für 30-60 min bei 25°C in einem Röhrchenrotator inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 2500 x g für 5 min bei RT sedimentiert, zweimalig gewaschen mit 1 mL Phosphatpuffer und 1 mL P-Lösung. Die Zellen wurden in 100 μ L P-Lösung resuspendiert (1×10^8 Zellen /mL). Im Anschluß daran wurden die fixierten Zellen mit 1 μ L frisch angesetztem 1 M DTT versetzt und für 10 min inkubiert. Der enzymatische Verdau der Zellwand, der für das Einbringen des Cy3 Fluoreszenz-Farbstoffes notwendig ist, wurde durch die Zugabe von 1 U Zymolase initiiert. Phasenkontrast mikroskopisch wurde der Verlauf des enzymatischen Verdaus kontrolliert (~50-70% dunkel gefärbte Sphäroplasten) und entsprechend durch Zentrifugation und durch zweimaliges Waschen mit P-Lösung gestoppt. Die so entstandenen Sphäroplasten wurden vorsichtig in 100 μ L P-Solution resuspendiert. Die Zellen wurden wie in 2.10.4 beschrieben auf den Objektträger übertragen, mit entsprechenden Puffern

behandelt und permeabilisiert. Nach der Permeabilisierung wurden die Zellen kurz mit P-Lösung gewaschen und anschließend für 2 min bei RT in frisch angesetzten 0,1 M Triethanolamin (pH 8,0) äquilibriert. Die Blockierung von polaren Gruppen erfolgte durch Behandlung mit 0,25% (v/v) Essigsäureanhydrid in 0,1 M Triethanolamin (pH 8,0) für 10 min bei RT. Durch eine anschließende Inkubation für 1 h bei 37°C in Prähybridisierungslösung wurde eine unspezifische Sondenbindung verhindert. Die Hybridisierung der Proben erfolgte mit einer Cy3 markierten Poly dT-Sonde (dT₅₀, Cyanin 3 markiert am 5'- und 3'-Ende, Biospring, Frankfurt/Deutschland), die 1:500 (0,2 µM) in Prähybridisierungs-Lösung verdünnt worden war. Es folgte die Inkubation über Nacht bei 37°C. Am Folgetag wurde die Sondenlösung entfernt und die Zellen mit 2 x SSC-Puffer für 1 h bei RT inkubiert. Eine weitere Inkubation mit 1 x SSC-Puffer erfolgte für 1 h bei RT. Der stringente Waschvorgang wurde fortgesetzt durch Inkubationen für je 30 min bei 37°C und bei RT mit 0,5 x SSC-Puffer. Es folgte eine Äquilibration der Zellen mit „Aby wash II“ für 5 min bei RT. Im Anschluß daran erfolgte das Anfärben der DNA mit Hilfe des Fluorochroms DAPI (30 µM in „Aby wash II“) für 3 min. Die DAPI-Lösung wurde entfernt und es erfolgte ein zweimaliges Waschen der Zellen mit „Aby wash II“ für je 5 min. Der Objektträger wurde luftgetrocknet und wie in 2.10.4 luftdicht mit Hilfe eines Deckgläschen abgedichtet und mikroskopisch betrachtet.

Prähybridisierungs-Lösung:

| | | |
|-----|---------|------------------------|
| 50 | % (v/v) | Deionisiertes Formamid |
| 4 | × | SSC (pH 7,0) |
| 1 | × | Dendhardts-Lösung |
| 125 | µg/mL | tRNA (10 mg/mL |
| 10 | % (w/v) | Dextransulfat |

1× Dendhardts-Lösung:

| | | |
|---|---------|----------------------|
| 1 | % (w/v) | Ficoll |
| 1 | % (w/v) | Polyvinylpyrrolidon |
| 1 | % (w/v) | BSA (BSA Fraktion V) |

1 X SSC (pH 7,4):

| | | |
|-----|----|---------------|
| 15 | mM | Natriumcitrat |
| 150 | mM | NaCl |

2.11.2 Northern Blot Analyse (modifiziert nach Lei *et al.*, 2001)

2.11.2.1 Northern „Dot Blot“:

Ein Northern „Dot Blot“ Experiment wurde in dieser Arbeit für die quantitative Analyse von Poly(A)⁺ RNA Level angewendet. Die Proben extrahierter Gesamt-RNA wurden in einem gelösten Volumen von 8 µL in regelmäßigen Abständen auf eine Hybond N⁺-Nylonmembran (GE Healthcare) getropft. Mit Hilfe eines „UV-Stratalinker 2400“ (2.1) erfolgte eine UV-Bestrahlung der Membran bei einer Wellenlänge von 254 nm und 120000 µJ/cm² im „AutoCrossLink“ Modus, die eine kovalente Verknüpfung von RNA-Molekülen und Nylonmembran bewirkte. Die Membran wurde anschließend im Rotator einer Hybridisierungskammer für mindestens 4 h bei 55°C in Prähybridisierungslösung inkubiert. Für die Hybridisierung der Membran mit einer radioaktiv markierten [³²P] Oligo-dT₅₂-Sonde wurde diese zu 8 x 10⁵ Zerfällen min⁻¹ mL⁻¹ in Prähybridisierungslösung verdünnt. Die entsprechende Sondenhybridisierung mit der Membran erfolgte über Nacht bei 55°C. Nach dieser Inkubationsphase wurde die Sonde entfernt und es folgte ein kurzes Waschen mit Waschpuffer bei RT. Schließlich folgten zwei stringente Waschschrte für je 10-20 min bei 55°C. Die Membran wurde in Saran-Folie eingeschweißt und in einer PhosphorImager Kassette über eine Photoplatte exponiert. Anschließend wurde die Photoplatte im PhosphorImager (2.1) eingescannt und die radioaktiven Markierungssignale mit Hilfe des Programmes Image Gauge 5.1 ausgewertet.

Sondenmarkierung:

Für die Sondenmarkierung erfolgte die Übertragung eines γ-Phosphat vom dATP auf die Hydroxylgruppe eines dT₅₂ Oligonukleotids (Metabion, Planegg-Martinsried). Für die Reaktion wurden 500 ng des Oligonukleotids mit 200 µCi γ-[³²P]-ATP (2.2) und 20 U T4-Polynukleotidkinase (Fermentas) versetzt und für 45 min bei 37°C inkubiert. Über eine Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 65°C für 5 min wurde die radioaktive Markierungsreaktion gestoppt. Mit Hilfe des „QIAquick Nucleotide Removal Kit“ (2.3) wurden überschüssige Radiomoleküle nach Angaben des Herstellerprotokolls entfernt.

Standardreaktionsansatz für die Herstellung einer radioaktiv markierten Oligo dT₅₂-Sonde:

| | | |
|----|----|---|
| 1 | µL | dT ₅₂ Oligonukleotid (500 ng/µL) |
| 20 | µL | µCi γ ³² P-ATP (10 µCi/µL) |
| 2 | µL | T4 Polynukleotidkinase (10 U/µL) |
| 17 | µL | ddH ₂ O |

2.11.2.2 Northern Blot (Denaturierende Formaldehyd-Agarosegel Elektrophorese und Vakuum Blot:

Ein Northern Blot wurde für die quantitative Analyse von spezifischen RNA-Expressionslevel angewendet. 70 µg Gesamt RNA wurden mit 10 µL Formamid, 3,5 µL 37% Formaldehyd und 2 µL 1 x „Running“-Puffer versetzt und für 15 min bei 65°C inkubiert. Die Proben wurden anschließend sofort auf Eis gekühlt. Ein Standardmarker wurde mit 400 ng/µL Ethidiumbromid versetzt. Anschließend wurden die RNA-Proben mit 3,5 µL RNA Probenpuffer versetzt und zusammen mit dem Standardmaker im 1,5% denaturierendem Formaldehyd Agarosegel für 3 h bei 50-70 V in 1 x „Running“-Puffer-Lösung elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurden die Markerbanden zur Kontrolle unter UV-Licht (320 nm) des Transilluminators (2.1) analysiert und fotografiert. Nach Waschen des Geles in 20 x SSC und 10 x SSC für je 10 min erfolgte der Transfer der RNA auf eine Hybond N⁺-Nylonmembran im Vakuum-Blot Verfahren. Der Transfer erfolgte bei einem angelegten Vakuum von 80-100 mbar für 1,5 h in 10 x SSC-Puffer-Lösung. Nach dem Vakuum Blot Transfer wurde die Membran wie für den Northern „Dot-Blot“ (siehe 2.11.2.1) beschrieben weiter behandelt. So erfolgte ein UV-„cross-linking“, die Prähybridisierung und Sondenhybridisierung mit der Membran. Anschließend erfolgte die Detektion der radioaktiven Signale im Phosphorimager.

Sondenmarkierung:

Für die Sondenmarkierung wurden aufgereinigte PCR-Amplifikate des zu analysierenden Gens über eine „random priming“ Methode radioaktiv markiert. 100 ng der doppelsträngigen DNA (dsDNA) wurden mit einem Decamer Nukleotid Gemisch („random primer“) in einem Gesamtvolumen von 12 µL bei 95°C für 10 min denaturiert. Die sich anschließende Markierungsreaktion wurden mit Hilfe des DECAprime II kit (2.3) und verwendetem α-[³²P]-dATP nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nicht eingebaute Nukleotide wurden anschließend mit Hilfe des QIAquick Nucleotide Removal kit (2.3) entfernt.

20 × SSC (pH 7,0):

| | | |
|-----|---|-----------------------|
| 3 | M | Natriumchlorid |
| 0,3 | M | Natriumcitrat, pH 7,0 |

5 x „Running“-Puffer (pH 6,8):

| | | |
|-----|----|---------------|
| 200 | Mm | MOPS |
| 50 | mM | Natriumacetat |
| 5 | mM | EDTA |

1 x „Running“-Puffer (pH 6,8):

| | | |
|-----|----|----------------------|
| 100 | mL | 5 x “Running”-Puffer |
| 89 | mL | Formaldehyd 37% |
| 311 | mL | H ₂ O |

RNA-Probenpuffer:

| | | |
|------|----|----------------|
| 50 | % | Glyzerin |
| 0,25 | % | Bromphenolblau |
| 0,25 | % | Xylencyanol |
| 1 | mM | EDTA, pH 8,0 |

Prähybridisierungslösung:

| | | |
|-----|-------|---------------------|
| 0,5 | M | Na-Phosphat, pH 7,5 |
| 7 | % | SDS |
| 1 | mM | EDTA |
| 50 | µg/µL | ssDNA |

Waschpuffer:

| | | |
|-----|----|---------------------|
| 40 | mM | Na-Phosphat, pH 7,2 |
| 0,1 | % | SDS |

2.11.3 RNA-Immunopräzipitation (modifiziert nach Hurt *et al.*, 2004)

In der RNA-Immunopräzipitation (RNA-IP) erfolgte experimentell die Elution von assoziierten RNAs an getaggten mRNA Bindeproteinen nach deren Immunopräzipitation. Als Negativkontrolle wurde ein isogener Wildtyp-Stamm ohne Protein-tag im Experiment mitgeführt. Zunächst wurde eine Vorkultur in 20 mL YPD oder SD-Mangelmedium angeimpft und über Nacht bei 25°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die resultierende stationäre Übernachtskultur in 400 mL neuem Kulturmedium auf eine Zellzahl von $0,5 \times 10^7$ Zellen/mL verdünnt und bei 25°C bis zum Erreichen einer Zelldichte von $3,5-5 \times 10^7$ Zellen/mL inkubiert. Danach wurden die Zellen bei $2500 \times g$ für 5 min bei 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 20 mL 1 x TBS-Puffer (2.10.3) aufgenommen und erneut bei $2500 \times g$ für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde das resultierende Pellet in 2 mL RNA-IP-Puffer resuspendiert, die Zellsuspension auf zwei

Reaktionsgefäße mit Schraubdeckeln zu gleichen Teilen überführt und bei 16100 x g für 1 min bei 4°C zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, erfolgte auf Eis die Zugabe von Proteasen-Inhibitoren, von einem Pellet-Volumen Glasperlen und von 2 x Pelletvolumen RNA IP-Puffer. Die Zellen wurden in der FastPrep®24-Maschine (2.1) bei einer Geschwindigkeit von 4m/sec für 30 sec bei RT mechanisch aufgebrochen. Im Anschluß daran erfolgte die Sedimentation von Zelltrümmern bei 16100 x g für 5 min bei 4°C. Der Überstand bzw. das Zelllysate wurde in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt und für 30 min bei 30°C mit 40 Kunitz Units DNase I (2.3) versetzt und inkubiert. Anschließend wurde die Suspension bei 16100 x g für 1 min bei 4°C erneut zentrifugiert. Eine Probe von 50-µL Lysat wurde für die „Input“-Kontrolle entnommen. Für die Immunopräzipitation des jeweiligen Fusionsproteins erfolgte zunächst die Inkubation des Lysats mit dem spezifischen Antikörper (anti-GFP oder anti-myc) für 1 h bei 4°C auf einem Drehrad. Die Kopplung des Antikörper-Fusionsprotein-Komplexes an zuvor äquilibrierte Protein G-Sepharose „Beads“ oder IgG-„Beads“ (je 20 µL) für TAP-getaggte Proteine erfolgte in einer dreistündigen Inkubation bei 4°C unter vorsichtigem Mischen. Nach dieser Inkubationsphase wurden die „Beads“ mit RNA-IP-Puffer gewaschen. Dieser Waschschrift wurde fünf Mal wiederholt. Schließlich wurde die RNA durch Inkubation der „Beads“ mit 100 µL Nuklease freiem ddH₂O bei 65°C für 10 min eluiert. Auf diese Weise lösen sich die RNA-Sekundärstrukturen, die das Lösen von RNA-Protein Bindungen erleichtert. Der Überstand wurde in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Die RNA-haltige Lösung wurde zur Befreiung von Proteinresten mit einer Phenol-Chloroform Extraktion und einer sich anschließenden Ethanol Präzipitation behandelt (2.11.4). Als „Input“-Kontrolle erfolgte parallel eine RNA-Präzipitation der entnommenen Lysatproben.

RNA IP-Puffer:

| | | |
|-----|----------|---------------------------------------|
| 25 | mM | Tris/HCl, pH 7,5 |
| 100 | mM | KCl |
| 0,2 | % (v/v) | Triton X-100 |
| 0,2 | mM | PMSF |
| 5 | mM | DTT |
| 10 | Units/mL | RiboLock™ RNase Inhibitor (Fermentas) |

2.11.4 RNA-Präzipitation

Für die RNA-Präzipitation aus Protein verunreinigten Lösungen wie sie z.B. in RNA IP-Eluaten (siehe 2.11.3) vorliegen können, wurde zunächst eine Phenol/Chloroform Extraktion durchgeführt. Hierfür erfolgte die Zugabe von einem Volumen Phenol/Chloroform-Lösung. Die Suspension wurde kräftig gevortext und anschließend bei 16100 x g für 5 min bei RT zentrifugiert. Nach der Phasentrennung wurde die wässrige Oberphase entnommen und mit einem Volumen 100% Chloroform versetzt und ebenfalls kräftig gemischt. Für die Phasentrennung erfolgte erneut eine Zentrifugation bei 16100 x g für 5 min bei RT. Mit dem Entnehmen der wässrigen oberen Phase, wurde nun die von Proteinen befreite RNA-Lösung erhalten. Für die Präzipitation der RNA erfolgte die Zugabe von 1/10 Volumen einer 3 M Ammoniumacetat-Lösung und die Zugabe eines dreifachen Volumens an 100%-igen Ethanol. Die Lösung wurde mehrfach invertiert und über Nacht bei -80°C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung bei 16100 x g für 45 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das RNA Pellet mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und nach Zentrifugation (16100 x g, 5 min, 4°C) bei 65°C für 5 min getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 10 µL Nuklease-freiem ddH₂O resuspendiert.

2.11.5 RNA Qualitätskontrolle mit Hilfe des Bio-Rad Experion™

Die Qualität der RNA nimmt auch Einfluß auf die Qualität von nachfolgenden Experimenten wie etwa Microarray Studien und qPCR. Daher erfolgte eine klassische Qualitätsanalyse über die RNA-Betrachtung in der Kapillar-Elektrophorese mit Hilfe des Bio-Rad Experion™ (2.1). Die ribosomalen rRNA Untereinheiten (25S, 18S und 5S rRNA) werden dabei der Größe nach aufgetrennt. Die entsprechende Software erstellt ein virtuelles Gelbild und ein korrespondierendes Elektropherogramm, indem die RNA-Intaktheit bzw. auch Degradationen visualisiert werden können. Darüberhinaus verfügt das Programm über die Funktion 25S/18S rRNA Verhältnisse zu berechnen und in einem RNA Qualität Indikator (RQI) Zahlenwert von 1-10 die RNA Integrität zu bewerten. Eine nicht degradierte, intakte RNA von sehr hoher Qualität wird durch einen Wert von 10 bestimmt. Für die Kapillarelektrophorese wurden „RNA StdSens Chips“ (BioRad Laboratories, Hercules/USA), standardmäßig unter Anwendung des Experion™ RNA StdSens Analysis Kit (2.3) nach Angaben des Herstellers beladen und in der Experion™ Elektrophorese Station gestartet.

2.11.6 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription wurde in dieser Arbeit mit Hilfe des „Omniscript Reverse transcription kit“ (2.3) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. 1 µg der gewonnenen RNA wurde vor der Reaktion für 5 min bei 65°C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gekühlt, um evtl. Bildungen von RNA Sekundärstrukturen, die die Reaktion stören können, zu vermeiden. Der Reaktionsansatz wurde wie folgt pipettiert und anschließend für 1 h bei 37°C inkubiert.

Standardansatz:

| | |
|----|--------------------------------------|
| 1 | x 10 x Puffer (Kit-Komponente) |
| 2 | mM dNTPs |
| 10 | U RiboLock™ RNase Inhibitor |
| 4 | U „Omniscript“ Reverse Transkriptase |
| 1 | µg RNA |

Der Ansatz wurde auf ein Volumen von 20 µL mit Nuklease freiem ddH₂O eingestellt. Die cDNA wurde vor bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

2.11.7 RNA Amplifikation

Eine Amplifikation von RNA Eluat Proben nach RNA-IP Experimenten ist aufgrund der geringen Ausbeuten notwendig, wenn diese im Anschluß in Microarray Experimenten analysiert werden soll. Für die Amplifikation wurden je 1 µg RNA Eluat eingesetzt, die nach Anwendung des Message Amp II Kit (2.3) eine etwa 100-fache Vermehrung der RNA erzielen. Das Protokoll richtete sich nach Angaben des Herstellerprotokolls.

2.11.8 Microarray

Microarray Analysen von RNA-Eluaten aus RNA-IP-Experimenten ermöglichen die Genomweite Analyse von *in vivo* gebildeten RNA-Protein-Komplexen. In dieser Arbeit wurde ein besonderes Augenmerk auf das RNA-Bindungsprofil von mRNA Bindeproteinen gelegt. Für die Analyse einer potentiellen Transkript Spezifität von mRNA Bindeproteinen wurde daher

das Zielprotein endogen getaggt und als Postivkontrolle in der RNA-IP eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde ein ungetaggtter Wildtyp-Stamm mitgeführt (2.11.4).

Die über eine RNA IP eluierte RNA sowie Lysatproben aus den RNA-IP Negativ- und Positivkontrollen wurde anschließend mit Hilfe der „Microarray“ Technik qualitativ und quantitativ ausgewertet. Für die Herstellung der zu hybridisierenden Proben erfolgte zunächst die cDNA-Synthese unter Einbau von Aminoallyl dUTP's, die eine Fluoreszenzfarbstoffmarkierung ermöglichen. Hierfür wurden 4 µg amplifizierte RNA (siehe 2.11.7), gelöst in 8 µL Nuklease-freiem ddH₂O, eingesetzt und mit 3 µL Oligo dT „Primer“-Lösung versetzt. Nach dem Denaturieren der Proben bei 70°C für 10 min im Thermocycler (3.1) erfolgte eine „Primer“-Anlagerung an die einzelsträngige RNA in einer Inkubationsphase von 10 min bei RT. Die Proben wurden anschließend nach Herstellerprotokoll des CyScribe Post-Labeling Kits (2.3) mit einem Reverse Transkriptions-Mix vorsichtig gemischt und für 1,5 h bei 42°C im Thermocycler inkubiert. Nach diesem Aminoallyl dUTP inkorporierenden cDNA-Synthese Schritt erfolgte die Zugabe von 2 µL 2,5 M NaOH um restliche RNA Strukturen zu degradieren. Dieser Ansatz wurde für 15 min bei 37°C inkubiert. Die anschließende Zugabe von 10 µL 1M HEPES bewirkt die erforderliche Neutralisierung des pH-Wertes im Ansatz. Danach wurden die Proben über das CyScribe GFX Purification kit (2.3) säulentechnisch nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die auf diese Weise gereinigte modifizierte cDNA wurde mit den Cy3- und Cy5-Fluoreszenzfarbstoffen des CyScribe Post-Labeling Kit (2.3) vermischt und für 1,5 h unter Lichtausschluß inkubiert. Die Probenanordnungen der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoff Markierungsansätze wurden dabei für die Array-Hybridisierung folgendermaßen gewählt.

| Fluoreszenzfarbstoff | Aminoallyl cDNA Probe | Probenkombination für Array-Hybridisierung |
|----------------------|----------------------------------|---|
| Cy3 | Lysat Gbp2-myc-Stamm (HKY820) | Lysat/Eluat Gbp2-myc-Stamm (Positivkontrolle) |
| Cy5 | Eluat Gbp2-myc-Stamm (HKY820) | |
| Cy3 | Lysat Hrb1-myc-Stamm (HKY821) | Lysat/Eluat Hrb1-myc-Stamm (Positivkontrolle) |
| Cy5 | Eluat Hrb1-myc-Stamm (HKY821) | |
| Cy3 | Lysat ungetaggtter-Stamm (HKY36) | Lysat/Eluat ungetaggtter-Stamm (Negativkontrolle) |
| Cy5 | Eluat ungetaggtter-Stamm (HKY36) | |

In der Zwischenzeit erfolgte eine Blockierung der Array Glasträger in einer BSA-haltigen Blockierungs-Lösung, um unspezifische Hybridisierungen zu unterbinden. Hierfür erfolgte ein Überführen der Array-Glasträger in Blockierungs-Lösung, dem eine Inkubationsphase für 20-30 min in der Hybridisierungskammer bei einer Temperatur von 55°C folgte. Anschließend wurden die Objektträger nacheinander in fünf mit ddH₂O gefüllten Glasschälchen durch kräftiges Hin- und Herschwenken für 3 min gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift folgte zum Trocknen der Objektträger ein Zentrifugationsschritt in Falcon-Gefäßen bei 1500 rpm für 3 min und RT. Die Glasträger wurden bis zur Hybridisierungsreaktion zur Seite gelegt. Die Cy3/Cy5-Farbstoff markierten cDNAs wurden nach der Inkubationsphase über das CyScribe GFX-Purification kit (2.3) gereinigt und mit 60 µL Elutionspuffer eluiert. Nun wurden die jeweils zugehörigen Cy3- und Cy5-markierten Lysat und Eluat Proben miteinander vermischt und mit je 3 µL Hefe-tRNA und ssDNA versetzt. Die Proben wurden in einer „Speed Vac“ auf ein Volumen von 26 µL konzentriert. Anschließend folgte die Zugabe von 10 µL 20 x SSC und 4 µL 2% (w/v) SDS. Die Proben wurden bei 95°C für 2 min erhitzt und anschließend direkt auf die cDNA-Array Glasträger luftblasenfrei pipettiert. Der Glasträger mit der Probe wurde mit Hilfe eines Hybridisierungs-Deckgläschen (HybriSlip™ Hybridization cover, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) bedeckt und in ein Falcon-Gefäß überführt, welches zuvor mit in 1 mL 3 x SSC; 0,1% (w/v) SDS befeuchtetem „Kimwipe Lite“-Papier ausgelegt worden war. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht in einer Hybridisierungskammer bei 55°C. Am folgenden Tag wurde überschüssiges, nicht hybridisiertes Material von den Array-Glasträgern in fünf Waschschritten entfernt, wobei alle Waschlösungen zuvor entgast wurden. In den ersten drei Schritten erfolgten die Waschungen der Glasträger in jeweils 200 mL ddH₂O; 0,1 x SSC und 0,1% (w/v) SDS für 5 min unter vorsichtigem Schwenken. Die nächsten zwei Waschungen wurden in 200 mL ddH₂O; 0,1 x SSC durchgeführt, bevor im letzten Schritt ein Waschen der Proben für 30 sec in 200 mL ddH₂O erfolgte. Danach wurden die Glasträger durch Zentrifugation getrocknet und mit gasförmigem Argon final behandelt, um diese von Kleinstpartikeln zu befreien. Es folgte das Einscannen der Glasträger im Scan Array Express (2.1). Mit Hilfe des Scan Array Express Programms wurden die gewonnenen Rohdaten mit Hilfe einer Y6.4K6.GAL-Datei, die die jeweiligen Gen-Lokalisationen auf dem Array identifiziert, als „gpr“-Dateiformat abgespeichert und anschließend statistisch von der IMT Microarray Unit (Florian Finkernagel und Birgit Samans) ausgewertet.

Blockierungs-Lösung:

| | | |
|-----|---|--------------|
| 5 | x | SSC (2.11.2) |
| 0.1 | % | SDS |
| 1 | % | BSA |


2.11.9 Quantitative RT-PCR (qRT-PCR bzw. "real time" PCR)

Für die Bestimmung der Expressionsrate eines Gens aus einer RNA-Population in Echtzeit („real-time“) wurde die qRT-PCR angewendet. Voraussetzung für die Durchführung ist die Herstellung von cDNA aus RNA in einer reversen Transkription (siehe 2.10.9). Die qRT-PCR wurde mit Hilfe des Absolute QPCR SYBR Green Mix durchgeführt. Dieser Mix enthielt den SYBR® Green I Farbstoff, der bei Interkalation in doppelsträngige DNA (dsDNA) unter Anregung fluoresziert. Eine quantitative Aussage über das Expressionsniveau des Gens wird daher möglich, da sich die Fluoreszenzsignale proportional zur Synthese von dsDNA verhält. Darüber hinaus sind im qRT-PCR SYBR Green Mix eine Thermo Start™ DNA Polymerase, dNTP's sowie ein DNA Polymerase Reaktionspuffer enthalten. Der Reaktionsmix wurde nach folgendem Schema pipettiert.

Standardansatz:

| | |
|-----|-------------------------------------|
| 10 | µL 2 x Absolute QPCR SYBR Green Mix |
| 0,2 | µL Primer 1 (10 µM) |
| 0,2 | µL Primer 2 (10 µM) |
| 4,6 | µL ddH ₂ O |
| 5 | µL cDNA (Verdünnung 1:50) |

Standard-qRT-PCR Programm:

| | | | | |
|-----------|---|------------------|---|------------------------|
| 40 Zyklen |  | 95°C | 15 min | Initiale Denaturierung |
| | | 95°C | 30 sec | Denaturierung |
| | | 50-60°C | 30 sec | Hybridisierung |
| | | 72°C | 1 min/1kb DNA | Elongation |
| | | 55-60°C bis 95°C | Ermittlung einer Schmelzkurve (0,5°C Erhöhung je Zyklus; 70 Zyklen) | |

Das Fluoreszenzsignal wurde nach jedem Amplifikationsschritt über das Mx3000P Real-Time PCR System (2.1) gemessen und als Ct Wert dargestellt. Nach einem Standardprotokoll wurden nach 40 Zyklen eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, indem die Temperatur langsam kontinuierlich erhöht wird (55°C-60°C→95°C). Bei einer für das Fragment spezifischen Schmelztemperatur denaturiert der Doppelstrang zu zwei

einzelsträngigen Molekülen. Der Fluoreszenzfarbstoff wird dabei freigesetzt und die Fluoreszenzabnahme wird registriert. Da doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt hat als beispielsweise unspezifische Primerdimere, kann eine genaue Unterscheidung erfolgen.

Die resultierenden Ct-Werte (engl. *Cycle Threshold* = Schwellenwert-Zyklus) aus Lysat („Input“-Kontrolle) und Eluat-Probe der RNA-Ko-IP wurden hinsichtlich einer Eluat Expressionsanreicherung in einer folgenden Formelberechnung analysiert:

x-fache Anreicherung: $2^{(Ct_{Input} - Ct_{IP})}$

Standardabweichung: $\ln 2 \sqrt{Stabw_{Input}^2 + Stabw_{IP}^2}$

3.0 Ergebnisse

3.1 Die Bedeutung von *NPL3* im Transportprozess von mRNAs und der präribosomalen 60S Untereinheit

Das mRNA Bindeprotein Npl3p bildet neben Gbp2p und Hrb1p die Gruppe der Serin/Arginin (SR)-ähnlichen Proteine in *S. cerevisiae*. Die Namen gebenden SR oder RS Dipeptid-Sequenzwiederholungen sind u.a. wichtig für Protein-Protein-Wechselwirkungen. Darüber hinaus weisen alle drei SR-Proteine zwei bis drei putative RNA-Erkennungsmotive („RNA recognition motifs“ = RRM) auf (Windgassen *et al.*, 2003; Birney *et al.*, 1992; Konkel *et al.*, 1995; Senger *et al.*, 1998), über die sie ko-transkriptional mit der mRNA assoziieren und damit Bestandteil des zu exportierenden mRNP-Komplexes sind (1.9). Neben der etablierten Funktion im mRNA Export wurde eine weitere Funktion in der Translation postuliert, da etwa 30% der SR-ähnlichen Proteine mRNA assoziiert mit aktiven Translationskomplexen in Sucrose-Dichtegradienten ko-sedimentieren (Windgassen *et al.*, 2004). Ob und welche spezifische Rolle den SR-Proteinen in der Translation zuzusprechen ist, ist bislang noch nicht geklärt. Eine *NPL3* Deletion ist in einigen Stammhintergründen, wie z.B. in dem S288C-Stammhintergrund nicht überlebensfähig. In einem weltweit organisierten systematischen Deletionsprojekt (Winzeler *et al.*, 1999) erfolgte die Herstellung einer *NPL3* Deletionsmutante in dem Stammhintergrund *BY4741*, die überlebensfähig, jedoch wachstumsdefekt ist (Abb. 9).

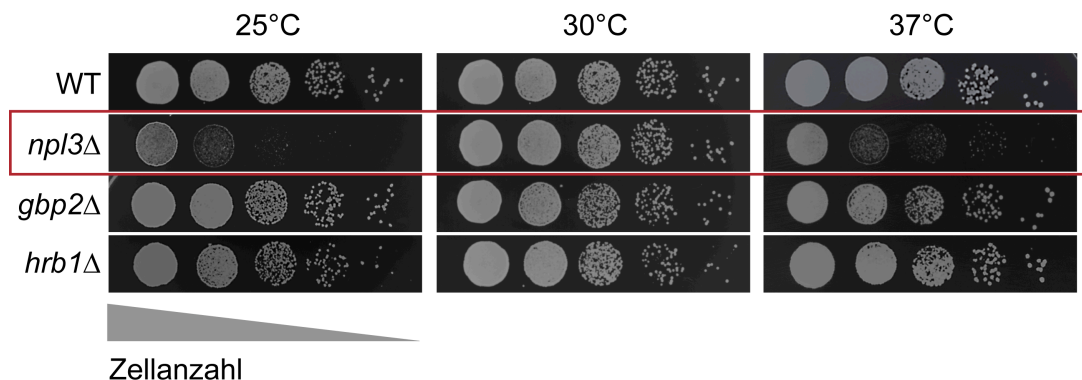


Abb. 9: Wachstumsanalyse serieller Zellverdünnungen charakterisieren den Wachstumsdefekt des *npl3Δ* im Vergleich mit dem korrespondierenden Wildtyp, *gbp2Δ* und *hrb1Δ* des *BY4741*-Stammhintergrund. Für den Wachstumstest (2.9.3) wurden identische Zellmengen von Wildtyp (WT), *npl3Δ*, *gbp2Δ* und *hrb1Δ* beginnend mit 1×10^5 und nachfolgenden 1:10 Verdünnungsschritten auf Agar-Vollmedium-Platten getropft und für 3 Tage bei 25°C, 30°C und 37°C inkubiert.

Bei einer Temperatur von 30°C zeigt der *NPL3*-Deletionsstamm ein zum Wildtyp vergleichbares Wachstum. Werden die Zellen jedoch bei 25°C inkubiert, so sind erhebliche Wachstumsdefekte erkennbar. Ebenso sind vergleichbare reduzierte Wachstumsraten bei

37°C beobachtbar (Abb. 9). Die Deletionen der SR-ähnlichen Proteine *gbp2Δ* und *hrb1Δ* im korrespondierenden Stammhintergrund weisen hingegen weder bei 25°C, 30°C noch bei 37°C einen Wachstumsdefekt auf. Die Wachstumsraten dieser beiden Deletionsstämme entsprechen dem des im Experiment mitgeführten isogenen Wildtyps (WT) (Abb. 9).

3.1.2 Eine Deletion von *NPL3* führt nicht zu mRNA Export-Defekten

Bisher wird *NPL3* in der Literatur als genereller mRNA Exportfaktor beschrieben. Temperatursensitive (ts) Mutationen von *NPL3* führen zu mRNA Akkumulationen im Zellkern, die über eine *in situ*-Hybridisierung mit einer Cy3 markierten Oligo dT₍₅₀₎-Sonde im S288C-Stammhintergrund visualisiert wurden (2.11.2) (Abb. 10; Lee *et al.*, 1996). Als Negativkontrolle wurde der isogene Wildtyp im Experiment mitgeführt, der die typische gleichmäßige Verteilung der Cy3 markierten mRNA in beiden Zellkompartimenten anzeigt. Ein Positivbeispiel für einen starken mRNA Export-Defekt liefert die temperatursensitive Nukleoporin-Mutante *rat7-1* des Kernporen-Komplexes. Das Nukleoporin *RAT7/NUP159* vermittelt spezifisch den mRNA Export in das Zytoplasma. Mutationen in seinem Gen führen zu mRNA Export-Defekten, nicht jedoch zu Protein Import- oder Export-Defekten. Entsprechend wurden in allen *rat7-1*-Zellen sehr starke mRNA Anreicherung im Zellkern beobachtet (Abb. 10). Starke mRNA Anreicherungen im Zellkern sind auch in den *NPL3*-Mutanten *np13-3* und *np13-41* in etwa 70%-75% der Zellen detektierbar, die in der RRM 1 Domäne eine bzw. zwei Aminosäuren-Austausche aufweisen (Abb. 10, Tab. 4). Nicht nur Mutationen in der RRM Domäne 1 führen zu abnormalen mRNA Akkumulationen im Zellkern. In der *np13-1* Mutante, welche eine Mutation in der RRM-Domäne 2 aufweist, konnten vergleichbare mRNA Export Defekte in 65% aller Zellen bestimmt werden (Abb. 10, Tab. 4). Die RRM 2 defekte Mutante *np13-48* (Tab. 4) weist hingegen einen schwächeren mRNA Export-Defekt in 40% der Zellen auf (Abb. 10). Sind beide RRM-Domänen durch eine Aminosäuren-Substitution mutiert, wie dies in der *np13-17* Mutante der Fall ist, so ist ein starker mRNA Export-Block in 70% aller Zellen detektierbar. In der C-terminalen SR-Domäne-Mutante *np13-27* sind hingegen keine mRNA Export-Defekte (Abb. 10; Tab. 4), wohl aber eine atypische Npl3p-Lokalisation im Zytoplasma zu erkennen (Windgassen *et al.* 2004). Diese steht im Zusammenhang mit einer fehlfunktionierenden zytoplasmatischen Dissoziation von Npl3p an Polysomen-assoziierten mRNAs und hat damit einen bereits gezeigten repressiven Effekt auf die Translationsrate (Windgassen *et al.*, 2004).

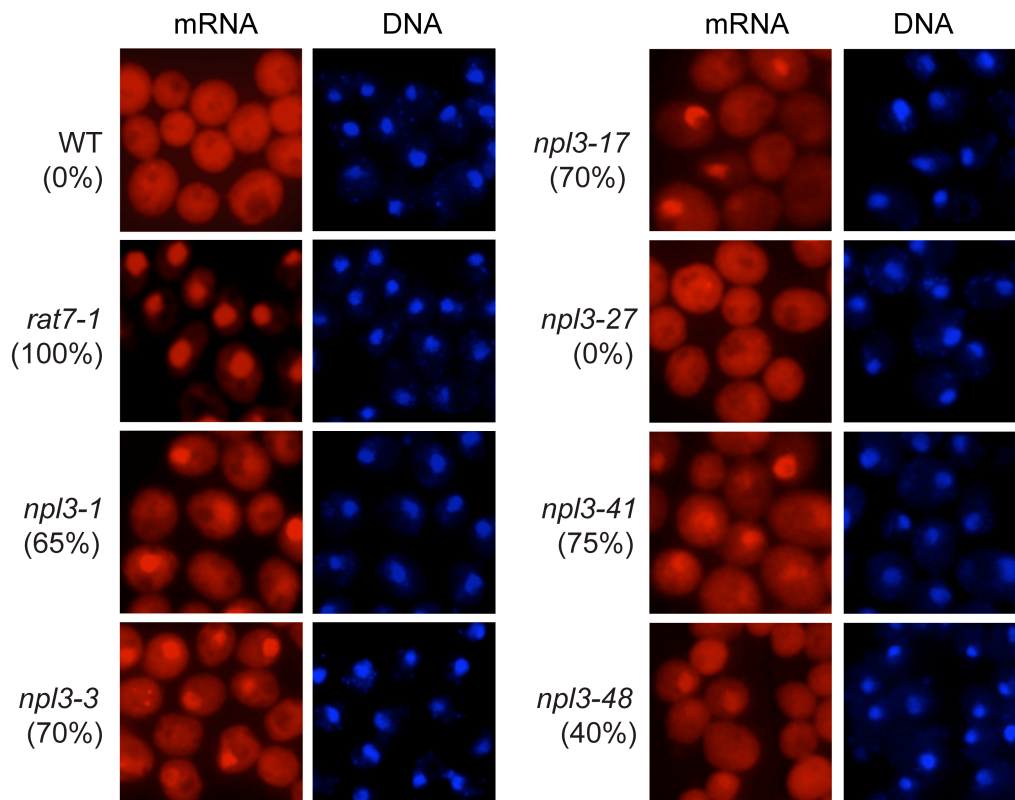


Abb. 10: Detektion von mRNA in *npl3* ts-Mutanten des S288C-Stammhintergrundes.

Poly(A)⁺ RNA/mRNA Lokalisationsstudien in Wildtyp, in der Nukleoporin-Mutante *rat7-1* und in verschiedenen *npl3*-Mutanten des S288C-Stammhintergrundes (Tab. 4). Hefezellen der logarithmischen Wachstumsphase wurden bei 25°C kultiviert, bevor diese für 1h bei 37°C inkubiert wurden. Die Detektion der mRNA erfolgte über eine *in situ* Hybridisierung mit einer in die Zelle eingebrachten Cy3 gekoppelten Oligo-dT₍₅₀₎-Sonde. Kernlokalisierte DNA wurde über eine DAPI-Färbung visualisiert. Der Anteil an Zellen, die einen Export-Defekt der Cy3-markierten mRNA anzeigten, wurden prozentual berechnet (in Klammern angegeben und Tab. 4).

Tab. 4: Übersicht *NPL3* Mutanten

| <i>NPL3</i> ts-Mutante | <i>npl3-1</i> | <i>npl3-3</i> | <i>npl3-17</i> | <i>npl3-27</i> | <i>npl3-41</i> | <i>npl3-48</i> |
|---|-----------------|-----------------|------------------------------------|-------------------|---|-----------------|
| Mutation und Domäne | | | | | E121G→ N-term. F183I→ RRM 1 S193P→ RRM 1 | |
| | A254V→ RRM 2 | S193P→ RRM 1 | F160L→ RRM 1 I268T→ RRM 2 | E409K→ C-term. | | S230P→ RRM 2 |
| Prozentuale Akkumulation von Cy3 markierter mRNA im Zellkern | 65% | 70% | 70% | 0% | 75% | 40% |

RRM = „RNA Recognition Motif“

Da eine Beziehung zwischen nukleärem Export von mRNA und dem pendelndem RNA Bindeprotein Npl3p gezeigt wurde (Abb. 10; Lee *et al.*, 1997), erfolgte im nächsten Schritt die

Analyse eines potentiellen mRNA Export-Defektes in *np13Δ* des *BY4741*-Stammhintergrundes. Wie im Experiment zuvor erfolgte die Fluoreszenz mikroskopische Lokalisationsanalyse von mRNA mittels Cy3-markierter Oligo dT₍₅₀₎-Sonde, die mit dem Poly(A)⁺ Bereich der mRNA hybridisiert. Interessanterweise zeigen sich in *np13Δ*-Zellen, die für 30 min bei 37°C inkubiert wurden keine abnormalen Akkumulationen von mRNAs im Zellkern (Abb. 11).

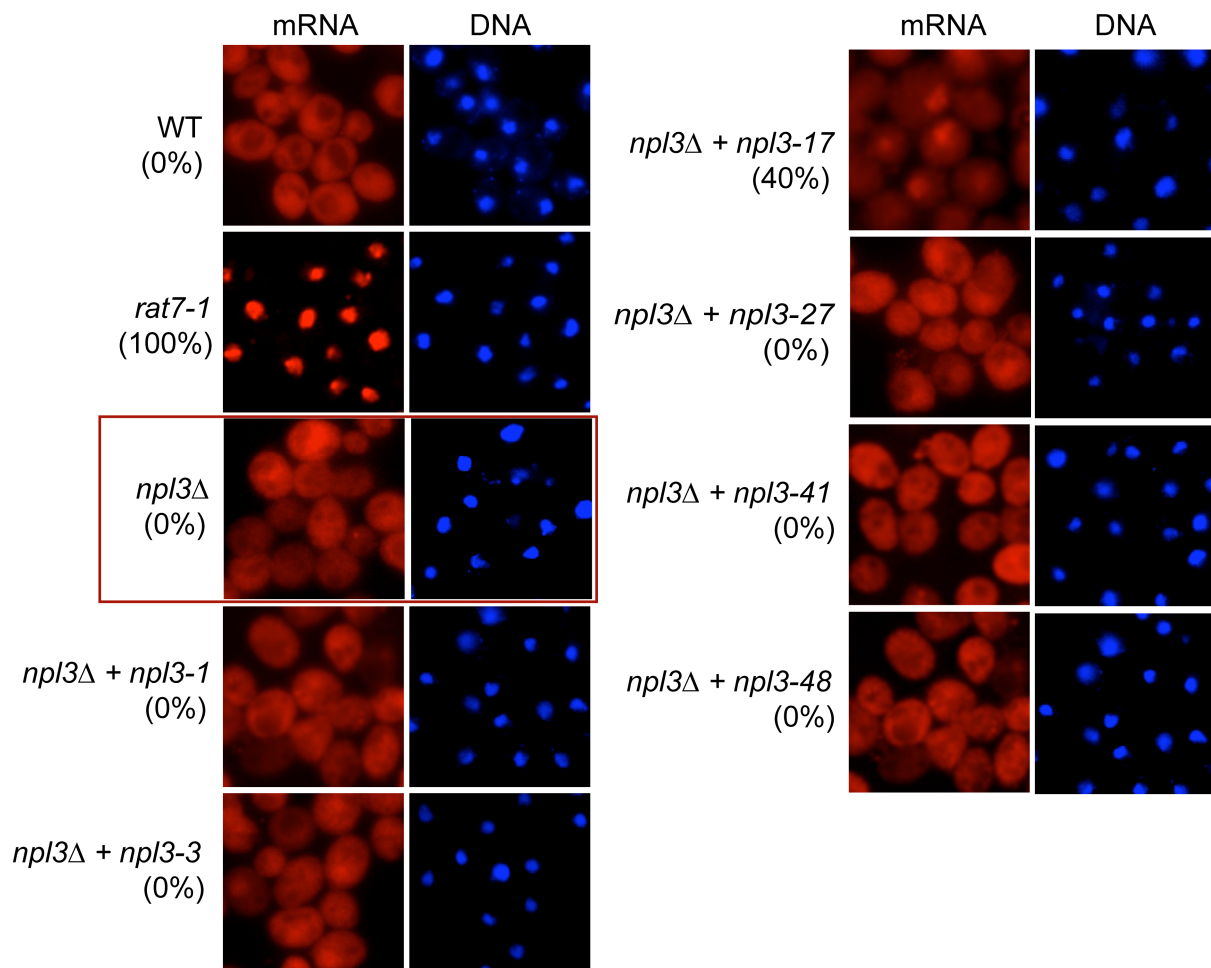


Abb. 11: Eine Deletion von *NPL3* im *BY4741*-Stammhintergrund führt zu keinen mRNA Export-Defekten. Fluoreszenz-mikroskopische mRNA Lokalisationsstudien in WT, *rat7-1*, *np13Δ* und verschiedene *np13*-Mutanten (Tab. 4) in *np13Δ*-Zellen (Tab. 4). Die angegebenen Stämme wurden bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase bei 25°C angezogen, bevor die Zellkultur für 30 min bei der restriktiven Temperatur 37°C inkubiert wurden. Die Detektion von Poly(A)⁺ RNA erfolgte über *in situ* Hybridisierungen mit einer in die Zelle eingebrachten Cyanin 3 gekoppelten Oligo-dT₍₅₀₎-Sonde. Kernlokalisierte DNA wurde über eine DAPI Färbung visualisiert. Der Anteil an Zellen, die einen mRNA Export-Defekt aufzeigten, wurde prozentual berechnet (in Klammern angegeben).

Offensichtlich ist die mRNA Export Funktion von *NPL3* im *BY4741*-Stammhintergrund nicht essentiell. Es besteht die Möglichkeit, dass *GBP2* und/oder *HRB1* oder andere mRNA Bindeproteine diese Funktion in *np13Δ* des *BY4741*-Stammhintergrundes übernehmen und kompensieren können. Des weiteren wurde untersucht, ob in *np13Δ*-Zellen Plasmid kodierte

Versionen der *np13*-ts-Mutanten (Tab. 4) im Sinne eines dominanten *np13*-Mutationseffekts auch im *BY4741*-Stammhintergrund Export-Defekte hervorrufen können (Abb. 11). Erstaunlicherweise löst das Einbringen der Plasmid kodierten *np13-17* Mutante, die in beiden RNA Bindedomänen eine Aminosäuren-Substitution aufweist, als einzige von allen analysierten *np13*-Mutanten (Abb. 11, Tab. 4) einen mRNA Export-Defekt aus. Diese in 40% der Zellen visualisierten mRNA Akkumulationen im Zellkern sind weniger stark ausgeprägt als in *np13-17* des *S288C*-Stammhintergrundes in 70% der Zellen (Abb. 10, Tab. 4). Dieses Ergebnis zeigt, dass Mutationen in beiden mRNA Bindedomänen von *NPL3* auch im *BY4741*-Stammhintergrund den korrekten Ablauf des mRNA Transports stören können und damit die Möglichkeit besteht, dass *NPL3* auch in diesem Stammhintergrund am mRNA Export beteiligt ist, dessen Funktion jedoch nicht essentiell ist. Nach wie vor bleibt zu klären auf welche molekularen Prozesse ein *np13Δ* Wachstumsdefekt zurückzuführen ist.

3.1.3 Eine Deletion von *NPL3* bewirkt keine signifikanten Störungen im Transkriptionsablauf

Die nicht beobachteten mRNA Export-Defekte in *np13Δ* können auf mRNA Transkriptionsdefekte und deren ko-transkriptionalen Prozessierungen zurückzuführen sein, die letztlich zu einem raschen nukleären RNA Abbau führen und damit auch die quantitative Auswertung der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung erschweren. Mit Hilfe einer [³²P] radioaktiv markierten Poly d(T₅₂)-Sonde wurde daher in *np13Δ* und WT der mRNA Gehalt im „Dot Blot“ Northern Experiment (2.11.2) quantitativ bestimmt (Abb. 12). Als Positivkontrolle für einen realen Transkriptionsdefekt wurde die Mutante *rpb1-1* mitgeführt, die eine Mutation in der RNA Polymerase II Untereinheit aufweist und die Transkription inhibiert. Dieses Experiment zeigt, dass in *np13Δ* weder bei 25°C noch bei 37°C signifikante Reduktionen im Vergleich zum wildtypischen mRNA-Transkript Level zu verzeichnen sind (Abb. 12). Die transkriptionsdefekte Mutante *rpb1-1* zeigt hingegen im Sinne einer Positivkontrolle eine 87%-85%-ige Reduktion des mRNA-Levels. Für die temperatursensitive Translationsinitiations-Mutante des eIF3-Komplexes *prt1-1* zeigt sich bei 37°C eine leichte Abnahme des Transkriptlevels um 18%. Defekte in der Translationsinitiation haben demnach im Sinne eines zellulären Rückkopplungsmechanismus nur einen marginalen Einfluß auf die mRNA Transkription.

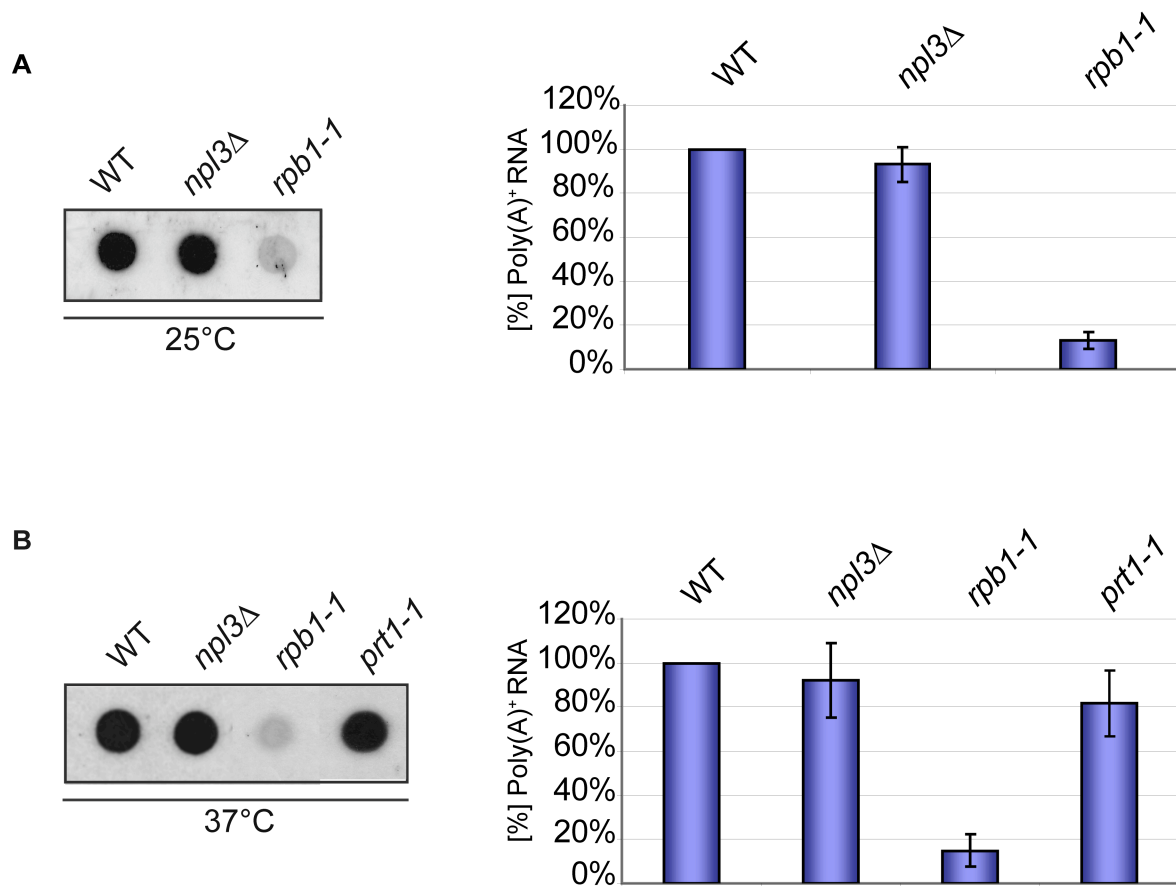
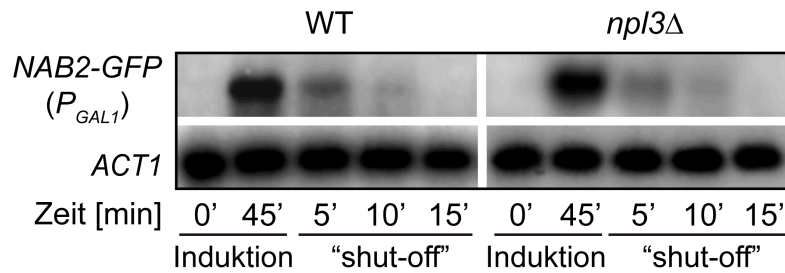


Abb. 12: Northern „Dot Blot“-Analyse zur Detektion des Poly(A)⁺ RNA Level in Wildtyp, *npl3Δ*, *rpb1-1* und *prt1-1*. Aus identischen Zellmengen ($2,5 \times 10^7$ Zellen) der bei A) 25°C oder B) bei 37°C für 30 min inkubierten Kulturen aus Wildtyp, *npl3Δ*, *rpb1-1* und *prt1-1* wurden äquivalente Volumenmengen an isolierter RNA auf eine Hybond-N⁺ Nylonmembran getropft. Über eine Hybridisierung mit einer [³²P] markierten Oligo-d(T₅₂)-Sonde erfolgte die Detektion von Poly(A)⁺ RNA. Der Grad der radioaktiven Markierung wurde anschließend im Phosphorimager und mittels des Programms Image Gauge 5.1 quantitativ in drei unabhängigen Experimenten ausgewertet. In jedem Experiment liefert die Stärke des radioaktiven Signals in WT den zu vergleichenden 100%-Wert.

Des weiteren erfolgte eine vergleichende Analyse der mRNA Stabilitäten anhand des Reportergens *NAB2-GFP* in WT- und *npl3Δ*-Zellen. Die Expression des *NAB2-GFP* wird über einen Galaktose induzierbaren Promoter (*GAL1*) angeschaltet. Die Zellen wurden daher bis zu einer logarithmischen Wachstumsphase in Raffinose-haltigem Medium bei 25°C kultiviert und anschließend bei 37°C inkubiert. Es erfolgte die Induktion des *GAL1*-Promoters zur Neusynthese des nachgeschalteten *NAB2-GFP* durch Zugabe von Galaktose. Nach 45 min wurde die Induktion durch Zugabe von Glukose gestoppt. Unmittelbar vor und 45 Minuten nach dieser Induktion erfolgten entsprechende Probennahmen gleicher Zelldichten ($OD_{600} = 0,6$). Weitere Proben wurden nach 5, 10 und 15 min der Synthesereprimierung entnommen. Gesamt RNA wurde aus den gewonnenen Proben extrahiert und im Northern Blot analysiert (2.11.2).



| | 45 min Induktion | 5 min "shut-off" | 10 min "shut off" | 15 min "shut-off" |
|---------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| WT | 100% | 16% ± 5% | 6% ± 2% | 0% ± 1% |
| <i>npl3</i> Δ | 103% ± 5% | 14% ± 5% | 4% ± 3 % | 0% ± 2% |

Abb. 13: Eine *NPL3*-Deletion hat keinen negativen Einfluß auf die mRNA Neusynthese oder mRNA Stabilität. Das Reportergen *NAB2-GFP* steht unter der Kontrolle des induzierbaren *GAL1*-Promoters und wurde in Wildtyp und *npl3*Δ-Zellen durch Transformation eingebracht. Die Zellen wurden in Raffinose-haltigem Selektiv-Medium bis zur logarithmischen Wachstumsphase bei 25°C angezogen und anschließend bei 37°C weiter inkubiert. Für 45 min erfolgte eine Induktion der Genexpression durch Zugabe von 2% Galaktose, die anschließend durch 2% Glukose gestoppt wurde. Zellproben wurden vor und nach der Induktion jeweils entnommen. Weitere Probennahmen erfolgten nach 5, 10 und 15 min des Induktionsstops („shut-off“). Die aus den Zellproben isolierte Gesamt-RNA wurde im Northern Blot analysiert. Die Detektion von *NAB2-GFP* und des als Ladekontrolle dienenden *ACT1*-Gens wurden mittels [³²P]-radioaktiv markierter *NAB2*- und *ACT1*-Sonde detektiert. Die Signalstärken wurden im Phosphorimager und dem Programm Image Gauge 5.1 in drei unabhängigen Experimenten analysiert. Das wildtypische *NAB2-GFP* Expressionsniveau nach 45 min Induktion liefert den zu vergleichenden 100% Wert.

Sowohl in WT als auch in *npl3*Δ können nach 45 min Induktion vergleichbare Mengen der neusynthetisierten *NAB2-GFP* mRNA beobachtet werden. Der zeitliche Abbau der mRNA in *npl3*Δ erscheint im Vergleich zum WT nur marginal fortgeschritten (2,5% stärkere Reduktion der mRNA Stabilitäten nach 10 min der Synthesereprimierung; Abb. 13). Demnach sind die Defekte in *npl3*Δ als nicht signifikant einzustufen.

Ein Transkriptionsdefekt kann auch auf Ebene der RNA-Polymerase I vermittelten Synthese von rRNA Strukturen erfolgen, die wichtige Komponenten der Ribosomen darstellen. Nach der Synthese wird die 35S rRNA zu den finalen rRNA Produkten 25S, 18S und 5.8S rRNA prozessiert. Die prozessierten 25S und 18S rRNAs können mithilfe einer Experion™ Kapillar-Elektrophorese (2.11.5) visualisiert werden. Dabei entsteht ein virtuelles Gelbild, in dem die 25S und 18S rRNA dargestellt sind. Das entsprechende Programm berechnet zur Bestimmung der RNA Integrität das Verhältnis aus 25S zu 18S rRNA. Bei RNA von hoher Qualität geht man von einem 25S zu 18S rRNA Verhältniswert von 2:1 aus. Die Kapillarelektrophoretisch aufgetrennten Gesamt-RNA-Proben aus Wildtyp und *npl3*Δ zeigen im Gelbild die vollständig prozessierten rRNA Endprodukte. Das Verhältnis aus 25S und 18S rRNA liegt in beiden Fällen bei ~2:1 (Abb. 14). Es sind damit keine Defekte in der rRNA Synthese und deren Prozessierung zu verzeichnen. Darüberhinaus wurde die RNA Qualität mit einem generierten RQI (RNA Quality Index) Zahlenwert ermittelt. Für beide Proben

wurde ein Qualitätshöchstwert (RQI) von 10 ermittelt. Folglich gibt es keinen Hinweis dafür, der für einen Prozessierungsdefekt von rRNA Molekülen in *np13Δ* spricht.

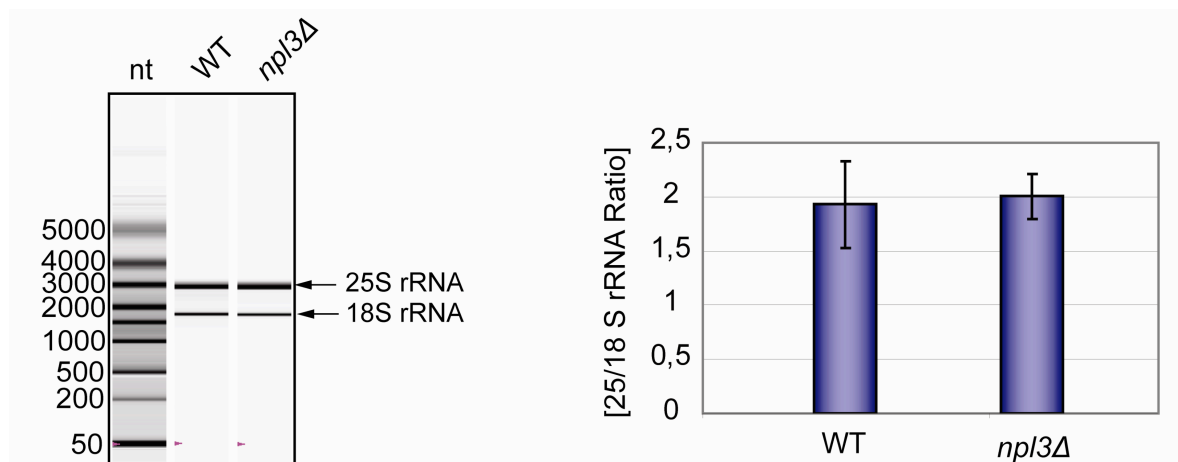


Abb. 14: Eine *NPL3* Deletion führt zu keinen rRNA Prozessierungsdefekten. Experion™ Kapillarelektrophoretisch generiertes Gelbild zur Analyse der prozessierten 25S und 18S rRNA. Die angegebenen 25S und 18S rRNA Verhältnis-Werte wurden in drei unabhängigen RNA Präparationen statistisch ausgewertet. Nt = Nukleotide

3.1.4 Eine Deletion von *NPL3* führt zu Defekten in der Proteinneusynthese

Nach den nicht detektierten mRNA Export-Defekten und RNA Synthese- oder Prozessierungsdefekten erfolgte die Analyse eines die Translation betreffenden Defektes in *np13Δ*. Dabei wurde die Proteinneusynthese überprüft. Für dieses Experiment wurden die Zellen in Methionin freiem Medium inkubiert. Nach Zugabe von radioaktiv markiertem [³⁵S]-Methionin wurde dessen Einbau in der Proteinneusynthese nach SDS-Gel elektrophoretischer Auftrennung der gewonnenen Lysate autoradiographisch im Phosphorimager quantifiziert. Wildtyp-, *np13Δ*, und *prt1-1*-Zellen wurden dabei sowohl bei 25°C als auch bei 37°C inkubiert. Bei 25°C zeigten sich in der Auswertung eine nur marginale Reduktion für *np13Δ* als auch für die temperatursensitive Translationsinitiationsmutante *prt1-1*. Jedoch zeigten *np13Δ*-Zellen nach 10 minütiger Inkubation bei 37°C eine Reduktion in der Proteinneusynthese von 40% ± 4% und nach 30 min eine Reduktion von 59% ± 6%. Nach 60 min kann hingegen ein Wiederanstieg der Synthese im Vergleich zum Wildtyp verzeichnet werden (32% ± 9%). Die mitgeführte *prt1-1* *ts*-Mutante weist einen nahezu vollständigen Stop in der Proteinneusynthese nach einer Inkubation bei 37°C für 10 min auf (Daten: Thomas Gross und Heike Krebber). Die Ergebnisse weisen auf eine Störung in *np13Δ* hin, die den Translationsablauf betreffen und nicht etwa sekundär auf stromaufwärts liegende Prozesse zurückzuführen sind wie etwa die RNA Transkription oder den mRNA Export. Die manifestierten Translationsdefekte in *np13Δ*

können darauf hinweisen, dass Npl3p eine neue noch nicht bekannte Funktion als Translationsfaktor einnimmt. Auf der anderen Seite ist Npl3p als mRNA assoziierter Faktor bekannt, der mRNA Moleküle bis hin zur Phase der Translationselongation bindet. Damit könnte Npl3p in der Formierung und/oder Stabilisierung katalytisch wirksamer Ribosomen involviert sein. Möglich wäre ebenfalls, dass Npl3p als genereller nukleärer Exportfaktor agiert, der auch den Transport präribosomaler Untereinheiten über rRNA und/oder Proteinbindung unterstützt. Ein fehlerhafter Transport dieser ribosomalen Vorläuferstrukturen in das Zytoplasma würde auch zu einer Verringerung der Anzahl an gebildeten Ribosomen führen und damit auch zu einer verminderten Translationsrate. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde der nukleäre Export der ribosomalen prä-60S und 40S Untereinheiten analysiert.

3.1.5 Eine *NPL3* Deletion bewirkt nukleäre Export-Defekte für die ribosomale prä-60S Untereinheit

Mit Hilfe der Reporterproteine Rpl25p-GFP (60S) und Rps2p-GFP (40S) wurde eine GFP mikroskopische Analyse der zellulären Verteilung durchgeführt, wobei als Positivkontrolle für einen Export-Defekt dieser Makromoleküle die *XPO1*-Karyopherin Mutante *xpo1-1* im Experiment mitgeführt wurde (Johnson *et al*, 2002; Tschochner & Hurt, 2003; Zemp & Kutay, 2007). Diese ts-Mutante zeigt bei 25°C keine, jedoch nach Inkubation bei 37°C für 30 min Export-Defekte für Rpl25p-GFP und Rps2p-GFP (Abb. 15 u. 16). In *npl3Δ* wird eine abnormale Akkumulation im Zellkern für das in einer Frühphase der Ribosomen-Biogenese assoziierende Rpl25p-GFP sowohl bei 25°C als auch bei 37°C deutlich erkennbar (Abb. 15). Dies bedeutet, dass der nukleäre Export der ribosomalen prä-60S Untereinheiten in *npl3Δ* tatsächlich gestört ist. In *gbp2Δ* und *hrb1Δ* wurden ebenfalls Akkumulationen des Rpl25p-GFP im Zellkern erkennbar. Diese Rpl25p-GFP-Signale sind jedoch im Zellkern weniger flächenfüllend wie in *npl3Δ* oder *xpo1-1* beobachtet, sondern lokal punktförmige Mislokalisationen. Ein derartiges Signal spricht für eine mögliche Mislokalisation von Rpl25p-GFP im Nukleolus von *gbp2Δ*- und *hrb1Δ*-Zellen. Im Vergleich dazu kann für das Reporterprotein der kleinen ribosomalen Untereinheit Rps2p-GFP weder in *npl3Δ* noch in *gbp2Δ* oder *hrb1Δ* ein Export-Defekt ermittelt werden (Abb. 16). Der Transport der kleinen ribosomalen Untereinheit wird demnach weder durch eine *NPL3* Deletion noch durch Deletionen von *GBP2* oder *HRB1* beeinträchtigt. (Abb. 16).

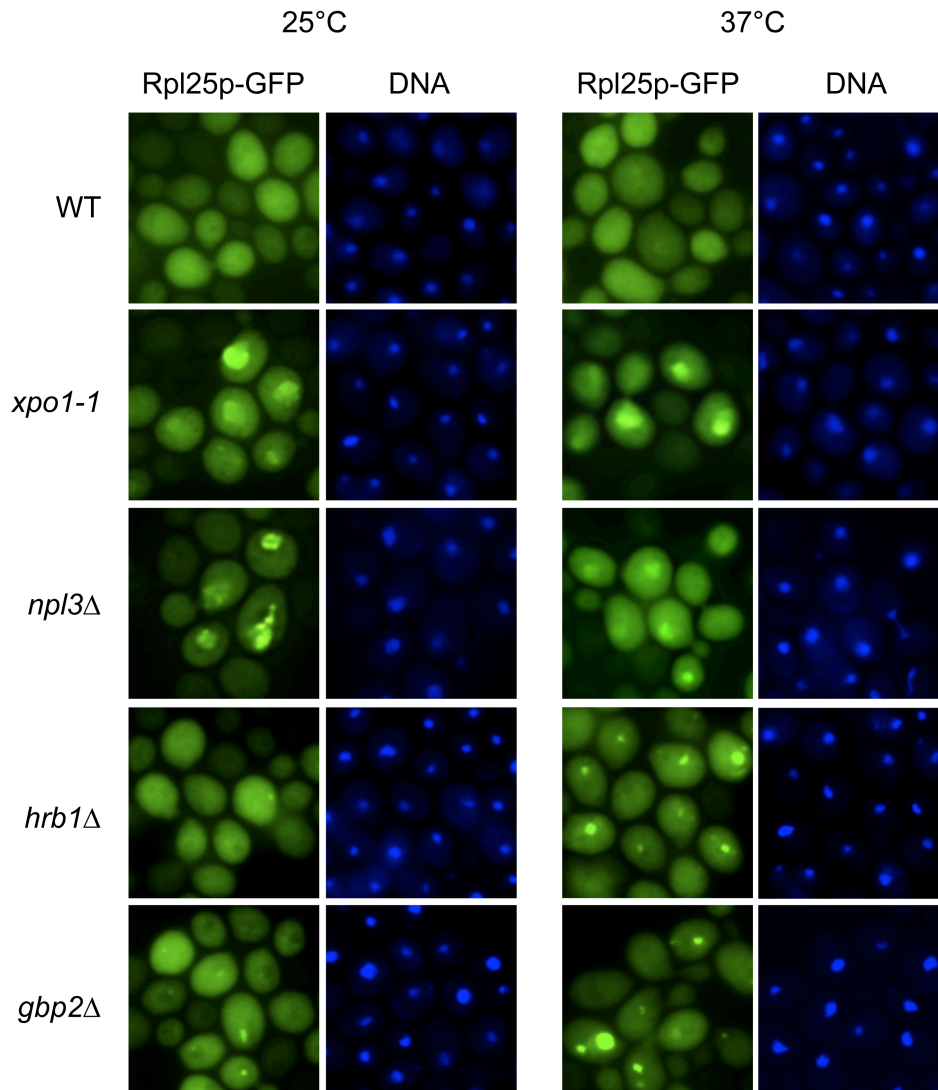


Abb. 15: Rpl25p-GFP Lokalisationsstudien in WT, *xpo1-1*, *npl3Δ*, *hrb1Δ* und *gbp2Δ*. Entsprechende Zellen wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase bei 25°C kultiviert. Die Zellkulturen wurden geteilt, wobei ein Teil weiterhin bei 25°C inkubiert und der andere Teil einem Temperaturwechsel nach 37°C für 30 min unterzogen wurde. Die Lokalisation des die ribosomale prä-60S-Untereinheit repräsentierenden Reporterproteins Rpl25p-GFP wurde im Fluoreszenz-Mikroskop analysiert.

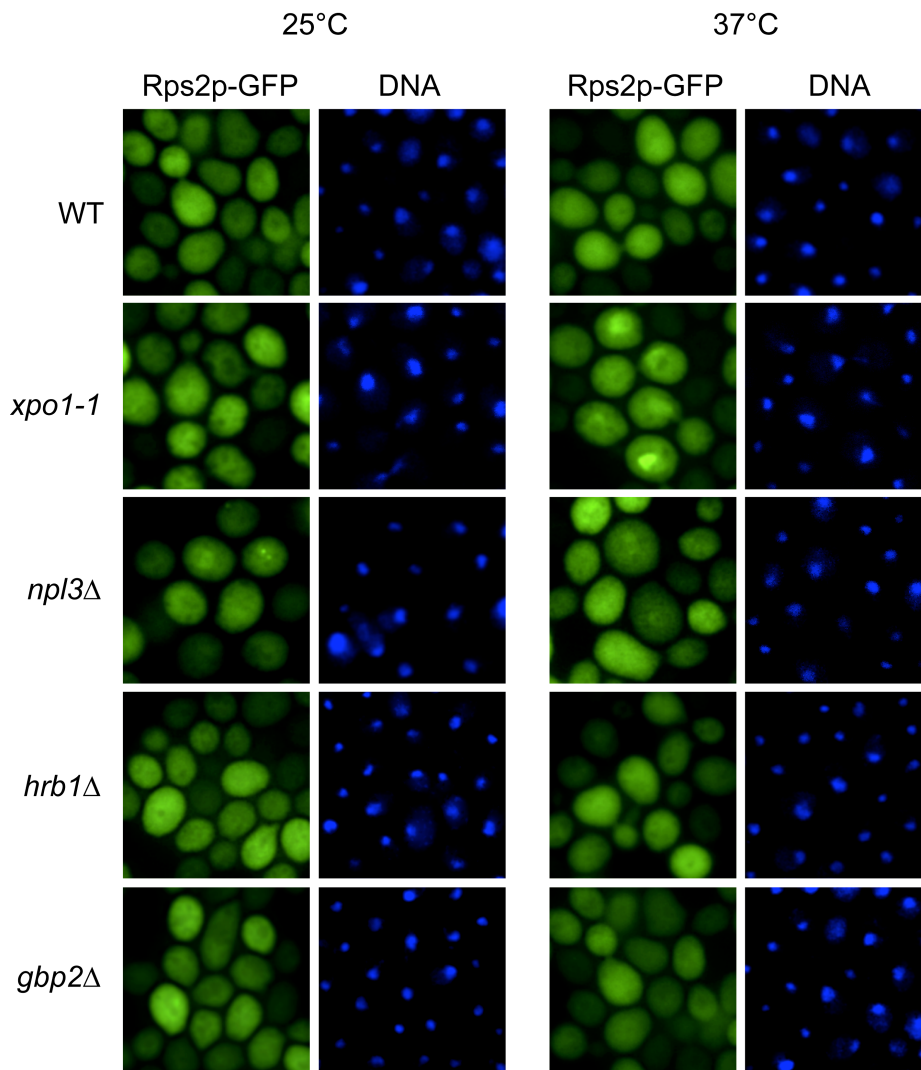


Abb. 16: Rps2p-GFP Lokalisationsstudien in WT, *xpo1-1*, *npl3Δ*, *hrb1Δ* und *gbp2Δ*. Entsprechende Zellen wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase bei 25°C kultiviert. Die Zellkulturen wurden geteilt und bei 25°C oder bei 37°C für 30 min inkubiert. Die intrazelluläre Lokalisation des die ribosomale 40S-Untereinheit repräsentierenden Reporterproteins Rps2p-GFP wurde im Fluoreszenz-Mikroskop analysiert.

3.1.6 *NPL3* interagiert physikalisch mit Komponenten der ribosomalen prä-60S Untereinheit

Um herauszufinden, ob Npl3p direkt mit der großen ribosomalen Untereinheit interagiert, erfolgte die Durchführung einer Ko-Immunopräzipitation (Ko-IP) (2.10.1). Für diese Analyse wurde das Reporterprotein Rpl25p-GFP immunopräzipitiert. Potentiell ko-präzipitierendes Npl3p wurde in den Eluaten nach Western-Blot und Immunodekoration mit entsprechendem Npl3p-Antikörper nachgewiesen (Abb. 16, A u. B). Um unspezifische Bindungen im Experiment ausschließen zu können, wurde die Abwesenheit eines Membran integralen Proteins der Mitochondrien, Hem15p, in den Eluaten überprüft (A u. B, Spur 3, 5, 8,10).

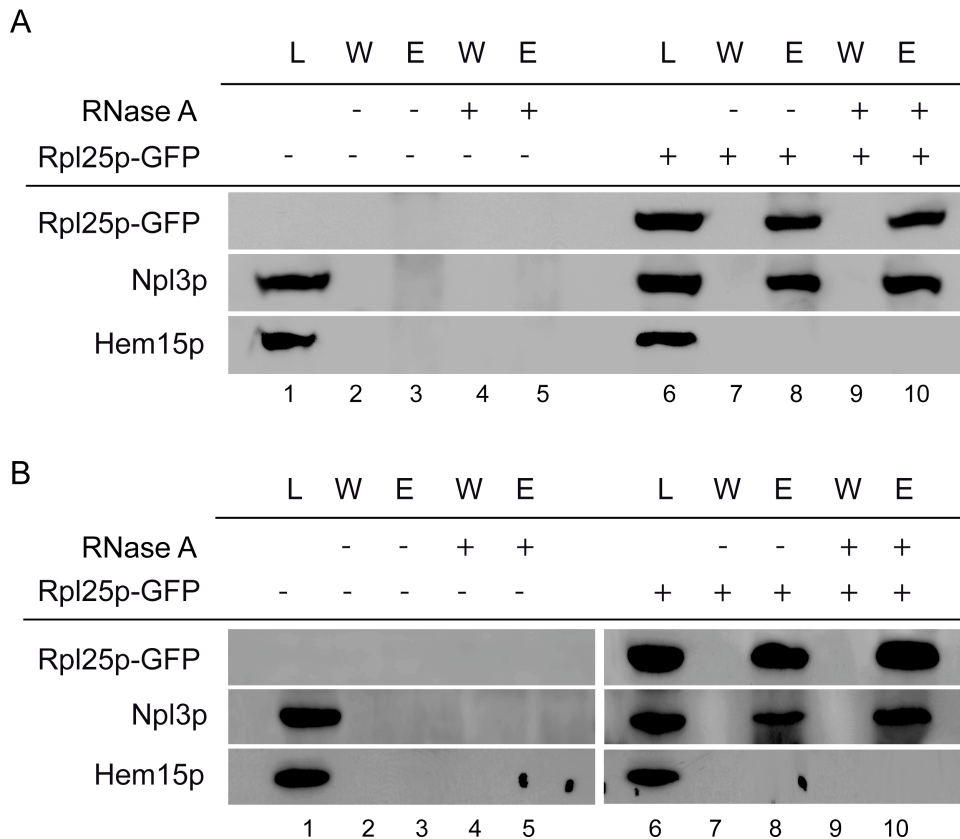


Abb. 17: Npl3p interagiert mit Rpl25p-GFP, Bestandteil der großen ribosomalen Untereinheit *in vivo* sowohl im A) BY4741- als auch im B) S288C-Stammhintergrund. Mit Hilfe eines GFP-Antikörpers wurde Rpl25p-GFP aus dem Lysat gebunden. Der Antikörper Protein Komplex wurde für 3-4 h an G-Plus Agarose „Beads“ gekoppelt. Nach fünfmaligem Waschen und Elution wurde nach SDS-PAGE (11%) und Western Blot Analyse die Präsenz des ko-präzipitierten Npl3p analysiert. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit α -GFP und α -Npl3p-Antikörpern. Als Ladekontrolle und um unspezifische Bindungen zu überprüfen, wurde Hem15p, ein Protein der mitochondrialen Matrix, mit einem α -Hem15 Antikörper analysiert. Lysat L = Lysat; W = 5. Waschschrift; E = Eluat

Das ko-präzipitierende Npl3p wurde in den Eluaten nach Western-Blot und Immunodekoration RNase A insensitiv nachgewiesen und damit eine physikalische Interaktion mit Rpl25p als Bestandteil der ribosomalen 60S Untereinheit gezeigt (Abb. 17, A u. B). Die Interaktion von Rpl25p-GFP mit Npl3p wird demnach nicht über RNA-Strukturen vermittelt. Diese Interaktion kann darüberhinaus in beiden Stammhintergründen (BY4741 und S288C) gezeigt werden (Abb. 17, A u. B). Die Interaktion zwischen Npl3p und Rpl25p hat somit einen generellen Charakter, da sie sowohl im *NPL3* essentiellen als auch im *NPL3* nicht essentiellen Stammhintergrund detektierbar ist. Analog erfolgte auch die Analyse einer Direktinteraktion mit der kleinen ribosomalen Untereinheit. So erfolgte ebenso eine Ko-IP mit GFP-getagtem Rps2p, Bestandteil der kleinen ribosomalen Untereinheit. In diesem Experiment wurde Rps2p-GFP immunopräzipitiert und ko-eluierendes Npl3p analysiert. Wie in der Abbildung 18 zu erkennen ist, interagiert Npl3p nur sehr schwach mit Rps2p und unterstreicht damit eine nicht vorhandene direkte Verbindung von Npl3p mit dem nukleären Export der kleinen ribosomalen 40S Untereinheit.

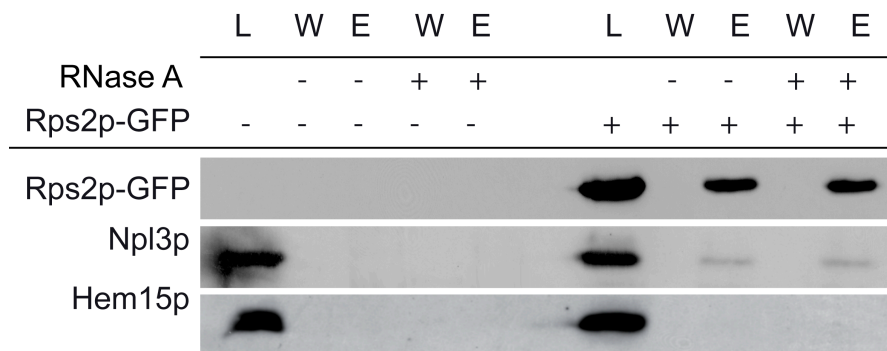


Abb. 18: Marginale Interaktion von Npl3p mit Rps2p-GFP, Bestandteil der ribosomalen 40S Untereinheit *in vivo*. Mit Hilfe eines GFP-Antikörpers wurde Rps2p-GFP aus dem Lysat gebunden und an G-Plus Agarose „Beads“ gekoppelt (BY4741 Stammhintergrund). Der Antikörper Protein Komplex wurde für 4 h inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen und Elution wurde nach SDS-PAGE (11%) und Western Blot Analyse die Präsenz des kopräzipitierten Npl3p analysiert. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit α -GFP und α -Npl3p-Antikörpern. Als Ladekontrolle wurde Hem15p mit einem α -Hem15 Antikörper analysiert.

Nicht auszuschließen ist hingegen die Möglichkeit, dass Npl3p sich bei einem Zusammenführen der ribosomalen 40S und 60S Untereinheiten im „subunit joining“ Prozess oder anderen zytoplasmatischen Translationsphasen in räumlicher Nähe des Rps2p Protein befindet und somit eine schwache Interaktion auftritt.

Im Weiteren wurde analysiert, ob Npl3p bereits in einer Frühphase der prä-60S Biogenese, die im Nukleolus als assembliertes 90S Präribosom beginnt, assoziiert. Um Hinweise zur Aufklärung dieser Fragen zu erhalten, wurden spezifische Ko-IP Studien durchgeführt. Rix1p bildet im Verband mit Ipi1, Ipi2 und Ipi3 den sog. Rix1-Komplex, der für die Prozessierung der 35S rRNA, Bestandteil des frühen 90S Präribosoms im Nukleolus von Bedeutung ist. Rix1p liegt mit dem 90S Präribosom assoziiert vor und transportiert nach dessen Spaltung die gebildete frühe Prä-60S-Untereinheit in das Zellkernplasma (Gadal *et al.*, 2001; Nissan *et al.*; 2002, Nissan *et al.*, 2004). Bevor weitere prä-60S-Prozessierungsschritte im Zellkern stattfinden wie z.B. die weitere Reifung der 27S rRNA zur 25S und 5,8S rRNA sowie die 5S rRNA Assoziation, dissoziiert das Rix1p Protein (Ho *et al.*, 2000; Trapman *et al.*, 1975). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass Npl3p RNase A unabhängig mit dem Rix1p Protein interagiert. (Daten Thomas Gross und Heike Krebber). Es wurde daher untersucht, ob Npl3p ebenso an 35S rRNA Moleküle des 90S Präribosoms bindet. Mit Hilfe einer Npl3p-myc spezifischen RNA Ko-IP (2.11.3) sollte eine differentielle Bindungsanalyse von 35S rRNA (90S-Präribosom), 25S rRNA (60S) und 18S rRNA (40S) mit Npl3p *in vivo* überprüft werden. Als Kontrolle wurde das in einer Spätphase der Export kompetenten prä-60S-Untereinheit assoziierende Nmd3p im RNA-IP Experiment mitgeführt. Dieser Faktor weist keinen Kontaktpunkt zur 35S rRNA auf, da es erst mit dem vollständig prozessierten und

Export-kompetenten prä-60S Molekül interagiert (Ho *et al.*, 2000). Als Negativkontrolle wurde für die Überprüfung potentiell unspezifischer RNA Bindungen ein Wildtyp-Stamm ohne Protein-„tag“ immunpräzipitiert. Nach der in Anwesenheit von DNase I durchgeführten Immunopräzipitationen von myc-Npl3p, Nmd3p-myc und Negativkontrolle erfolgte die Elution ko-gebundener RNAs. Nach der RNA-Aufreinigung und Präzipitation (2.11.4) wurde unter Verwendung eines „random“ Nonamer Primer die gewonnene RNA in der reversen Transkription in cDNA (2.11.6) umgeschrieben und in der RT-PCR für die Primer spezifische Amplifikation von 25S, 18S und 35S rRNA eingesetzt (Abb. 19).

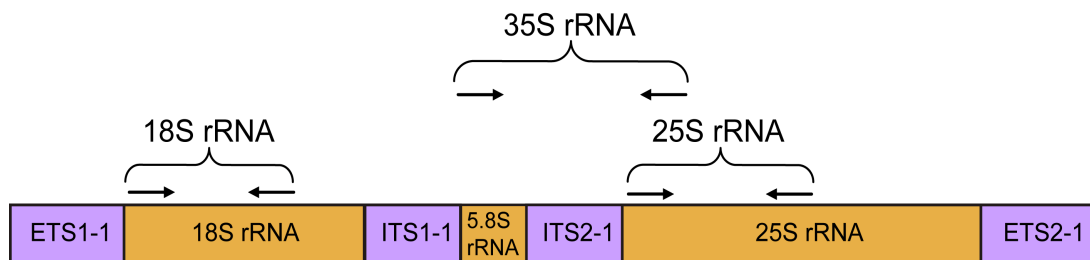


Abb. 19: Schematische Darstellung des 35S rDNA-Genlokus in *S. cerevisiae*. Eine rDNA-Einheit umfasst die am 5'- und 3'-Ende flankierenden transkribierten Bereiche („extern transcribed spacer“) (5'-ETS1-1 und 3'-ETS2-1). Der intern transkribierte Bereich („internal transcribed spacer“) ITS1-1 trennt die Prä 5.8S rRNA vom Prä 18S-Transkript. ITS2-1 separiert hingegen die Prä 25S rRNA vom Prä 5.8S Transkript. Das 35S-Transkript enthält somit drei der vier rRNA-Spezies. Die für die analysierten Sequenzabschnitte verwendeten „forward“ und „reverse“ Oligonukleotide sind als Pfeile dargestellt.

Npl3p-myc und Nmd3-myc assoziierte RNAs amplifizieren nach RT-PCR die 25S rRNA (Abb. 20, A). Die Anwesenheit dieser rRNA ist Indikator für eine Interaktion dieser Proteine mit der im Zellkernplasma vorliegenden ribosomalen prä-60S Untereinheit, die die 25S rRNA nach fortgeschrittener Reifung enthält. Des weiteren ist in dem RNA Eluat von Npl3p-myc die 35S rRNA ebenfalls amplifizierbar, während das Nmd3p-RNA Eluat im Sinne einer Negativkontrolle entsprechend kein Produkt liefert. Npl3p-myc assoziierte RNA amplifiziert nur zu einem sehr geringen Anteil die 18S rRNA (Abb. 20, A). Die in diesem Experiment identifizierte dominierende Assoziation von Npl3p mit 25S rRNA, die einen großen Anteil an der Ribosomenstruktur ausmacht, bestätigt eine direkte Interaktion mit der großen ribosomalen Untereinheit auch über rRNA Strukturen. Die in diesem Experiment identifizierte Assoziation mit der 35S rRNA liefert in Übereinstimmung mit einer vorgefundenen physikalischen Interaktion von Npl3p und Rix1p (Daten Thomas Gross und Heike Krebber) Hinweise für eine frühe Interaktion von Npl3p mit dem prä-ribosomalen prä-90S Komplex im Nukleolus.

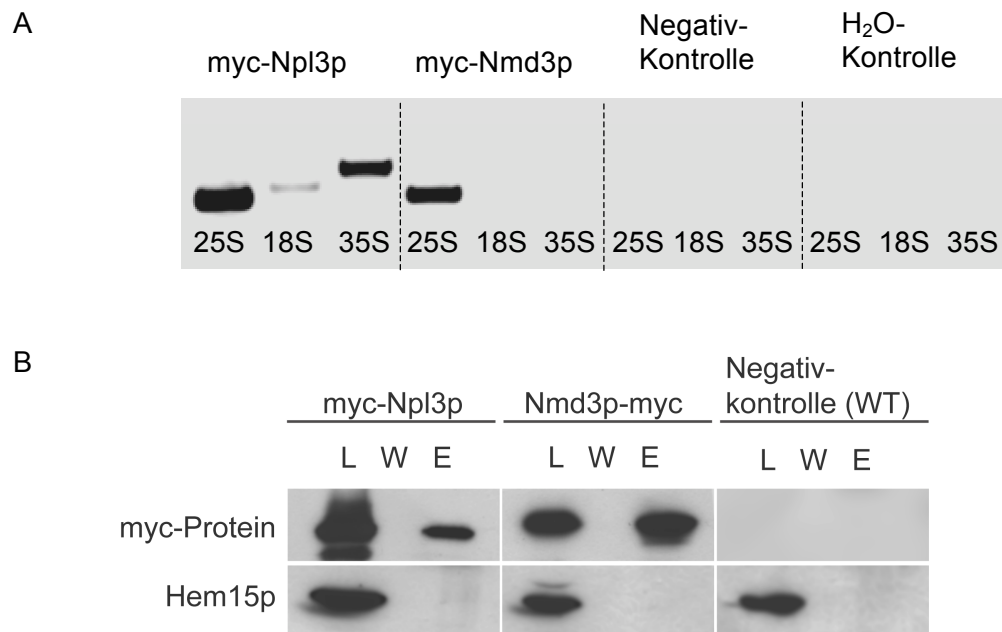


Abb. 20: RNA Ko-IP zur Analyse von Npl3p und Nmd3p assoziierten rRNAs. Myc-Npl3p-, Nmd3p-myc- und Wildtyp-Zellen ohne Protein-tag (Negativkontrolle) wurden bei 25°C bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase inkubiert. Nach Immunopräzipitation der myc getaggten Proteine erfolgte die Elution assoziierter RNAs. Je 1 µg eluierter RNA wurde in der Reversen Transkription zu cDNA umgeschrieben. In der nachfolgenden RT-PCR erfolgte die vergleichende Analyse amplifizierter 25S, 18S und 35S rRNAs mit sequenzspezifischen Oligonukleotiden. A) Gelbild, der im 2% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennten 25S (232 bp), 18S (280 bp) und 35S rRNA (398 bp) Amplifikate. Western-Blot Analyse von Lysat-, Wasch- und Eluat Fraktionen nach RNA-Ko-Immunopräzipitation (RNA-Ko-IP) von myc-Npl3p, Nmd3p-myc und Negativkontrolle. Der Nachweis der präzipitierten Proteine und Hem15p erfolgte mit Hilfe von α-myc und α-Hem15 Antikörpern.

Diese Beobachtung würde die Möglichkeit mit einschließen, dass die prä-60S Export-Defekte auch auf potentielle 35S rRNA Prozessierungsdefekte durch Npl3p zurückzuführen wären. Da die rRNA-Messungen im Experion™ (WT Vs *npl3Δ*) jedoch nicht zu unterschiedlichen rRNA Mengen oder Prozessierungsdefekten geführt haben, scheinen die prä-60S Export-Defekte nicht durch nukleolare rRNA Prozessierungsfehler hervorgerufen zu werden.

3.1.5 Npl3p agiert als unabhängiger Exportfaktor im nukleären Export der prä-60S Untereinheit

Da keine signifikanten rRNA Prozessierungs-Defekte (Abb. 14) aufgetreten sind und Rpl25p-GFP Export-Defekte in *npl3Δ* im Zellkernplasma des Zellkerns beobachtet wurden (Abb.15), können prä-60S Export-Defekte weiterhin in einer Npl3p Export-Adapter Funktion begründet liegen. Daher wurde analysiert, ob Npl3p mit bekannten Export Rezeptoren und/oder

Adaptoren der Export kompetenten prä-60S Untereinheit *in vivo* interagiert. Für den Export der prä-60S-Untereinheit sind derzeit drei bekannte Proteine als Export-Rezeptoren bekannt: Xpo1p, Mex67p/Mtr2p und Arx1p (Hung *et al.*, 2008; West *et al.*, 2007; Lo & Johnson, 2009). Diese vermitteln die Translokation dieser großen Komplexstrukturen über Direktinteraktion mit den Nukleoporinen des Kernporen-Komplexes. Eine bereits beschriebene Adapterfunktion für den Rezeptor Xpo1p stellt Nmd3p dar, welches über ein Leuzin-reiches NES-Signal Xpo1p rekrutiert (Ho *et al.*, 2000; Gadai *et al.*, 2001b). Nmd3p bindet nur korrekt gefaltete und vollständig prozessierte prä-60S-Untereinheiten (Johnson *et al.*, 2002). Nach derzeitigem Modell markiert seine Assoziation den Export kompetenten prä-60S-Komplex. Um Festzustellen, ob Npl3p eine Komponente des ribosomalen prä-60S Export Komplexes darstellt, wurde über eine Ko-IP eine Interaktion mit dem Export-Adapter Nmd3p untersucht (Abb. 21).

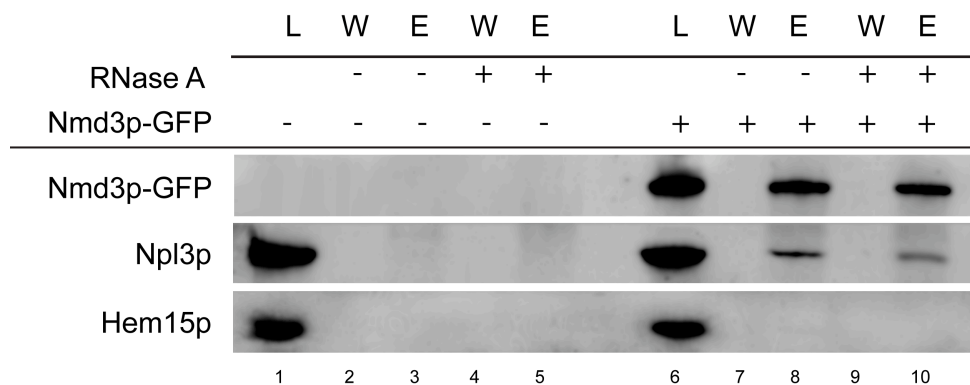


Abb. 21: Physikalische Interaktion von Nmd3p mit Npl3p *in vivo*. Für die Positivkontrolle wurden Wildtyp-Zellen mit Plasmid-kodiertem Nmd3p-GFP transformiert. Als Negativkontrolle wurde ein Wildtypstamm ohne Protein-tag mitanalysiert. Es wurde eine Nmd3p-GFP Ko-IP durchgeführt, wobei eine Detektion des endogenen Npl3p erfolgte. Lysate aus Zellen der Dichte $2,5 \times 10^7$ Zellen/ml wurden gewonnen und Nmd3p-GFP mit Hilfe des α -GFP-Antikörpers kovalent gebunden. Der Antikörper-Protein Komplex wurde über Protein G Plus Agarose präzipitiert. Nach fünfmaligem Waschen und Elution wurde nach SDS-PAGE (11%) und Western Blot Analyse die Präsenz des präzipitierten Nmd3-GFP und des ko-eluiierenden Npl3p mittels α -GFP- und α -Npl3-Antikörper analysiert. Als Ladekontrolle und um unspezifische Bindungen zu überprüfen, wurden Antikörper gegen Hem15p verwendet.

In dem durchgeführten Experiment erfolgte eine Nmd3p-GFP Immunopräzipitation und die Analyse nach Ko-gebundenem Npl3p. Abbildung 21 zeigt eine Interaktion von Npl3p mit Nmd3p, die als leicht RNase A sensitiv zu kennzeichnen ist (Spur 8 u. 10). Da Npl3p mit Nmd3p assoziiert vorliegt, besteht die Möglichkeit, dass Npl3p den Export kompetenten und korrekt gefalteten Zustand der großen ribosomalen Untereinheit markiert und damit die Assoziation zwischen Nmd3p und der großen ribosomalen Untereinheit reguliert. Um diese Frage zu klären, wurde die Interaktion von Nmd3p mit Rpl25p-GFP (Reporter für die prä-60S Untereinheit) parallel in *npl3Δ* und WT untersucht. Für die Untersuchung dieser Hypothese

erfolgte die Durchführung einer Ko-IP, in der Rpl25p-GFP in WT und in *np13Δ* immunopräzipitiert wurde, um eine potentielle Interaktion mit dem ko-eluierenden Nmd3p-myc immunologisch nachzuweisen (Abb. 22).

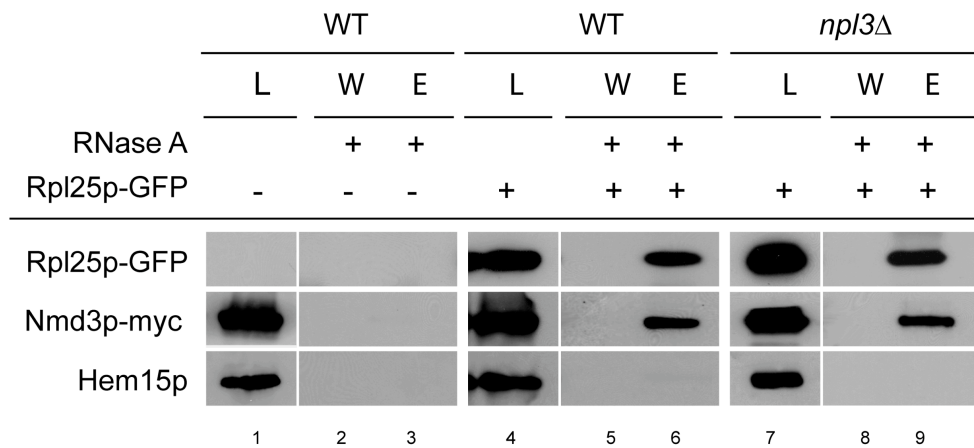


Abb. 22: Physikalische Interaktion von Rpl25p-GFP mit Nmd3p-myc in Wildtyp und in *np13Δ*. Wildtyp- und *np13Δ*-Zellen wurden mit Plasmid-kodiertem Rpl25p-GFP und Nmd3p-myc transformiert. Als Negativkontrolle wurde ein mit Nmd3p-myc transformierter Wildtypstamm ebenfalls analysiert. Es wurde eine Rpl25p-GFP Ko-IP durchgeführt, wobei eine Detektion des ko-eluierenden Nmd3p-myc erfolgte. Lysate aus Zellen der Dichte $2,5 \times 10^7$ Zellen/ml wurden gewonnen und Rpl25p-GFP mit Hilfe eines α -GFP-Antikörpers gebunden. Der Antikörper-Protein Komplex wurde über Protein G Plus Agarose „Beads“ präzipitiert. Nach fünfmaligem Waschen und Elution wurde nach SDS-PAGE (11%) und Western Blot Analyse die Präsenz des präzipitierten Rpl25p-GFP und ko-präzipitierten Nmd3p-myc mittels α -GFP und α -myc-Antikörpern analysiert. Als Ladekontrolle wurde Hem15p mit einem α -Hem15 Antikörper mitanalysiert. Berechnung der Signalstärken erfolgte mit Hilfe des Computer-Programms ImageJ in drei unabhängigen Experimenten.

In dieser vergleichenden Analyse konnte in *np13Δ* keine Veränderung in der Interaktion zwischen Nmd3p-myc und Rpl25p-GFP beobachtet und in der Berechnung der entsprechenden Signalstärken mit Hilfe des Programms ImageJ gemessen werden. Die RNase A insensitiven Interaktionen weisen relative Signalstärken von $34\% \pm 3\%$ in Wildtyp (Abb. 22, Spur 6) und $32\% \pm 2\%$ (Abb. 22, Spur 9) in *np13Δ* auf (Abb. 22, Spuren 4 u. 7). Npl3p steht damit in keinem Zusammenhang mit einer ausübenden Adapterfunktion für Nmd3p mit der großen ribosomalen Untereinheit.

Mex67p/Mtr2p wurde nicht nur als Rezeptor Heterodimer im Zusammenhang mit dem mRNA Export beschrieben (Segref *et al.*, 1997), sondern auch im Transportprozess der prä-60S Untereinheit (Yao *et al.*, 2007; Hung *et al.*, 2007; Lo & Johnson, 2009). Im *BY4741*-Stammhintergrund, in dem *NPL3* nicht essentiell ist, wurde eine physikalische Interaktion von Npl3p mit Mex67p bisher noch nicht untersucht. Wie in Abbildung 23 zu erkennen ist, besteht auch im *BY4741*-Hintergrund die RNase A insensitive Interaktion von Npl3p und Mex67p *in vivo*. In diesem Experiment wurde myc-Npl3p in *np13Δ* immunopräzipitiert und die Assoziation des ko-eluierenden Mex67p-GFP immunologisch nachgewiesen (Abb. 23).

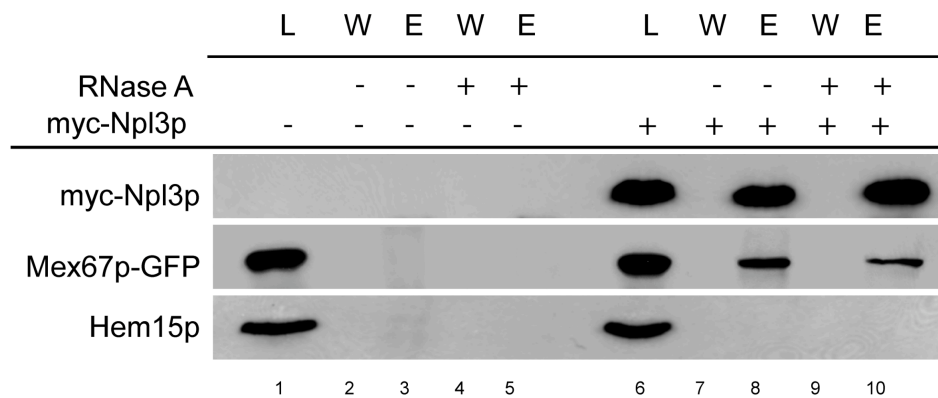


Abb. 23: Physikalische Interaktion von myc-Npl3p mit Mex67p-GFP *in vivo*. Für die Positiv-Kontrolle wurde Plasmid-kodiertes myc-Npl3p und Mex67p-GFP in *np13Δ*-Zellen transformiert (Spur 6-10). Als Negativkontrolle wurden *np13Δ*-Zellen mit dem Plasmid kodierten Mex67p-GFP transformiert und mitanalysiert (Spur 1-5). Lysate aus Zellen der Dichte $2,5 \times 10^7$ Zellen/ml wurden gewonnen und myc-Npl3p mit Hilfe des α -myc-Antikörpers gebunden. Der Antikörper-Protein Komplex wurde über Protein G Plus Agarose „Beads“ präzipitiert. Nach fünfmaligem Waschen und Elution wurde nach SDS-PAGE (11%) und Western Blot Analyse die Präsenz des präzipitierten myc-Npl3p und kopräzipitierenden Mex67p-GFP mittels α -GFP und α -myc-Antikörper analysiert. Als Kontrolle wurde Hem15p mittels α -Hem15 Antikörper analysiert.

Agiert Npl3p als Adapterprotein für den Rezeptor Mex67p auch im Transport der ribosomalen prä-60S Untereinheit, so würde eine Interaktion von Mex67p und der großen ribosomalen Untereinheit in *np13Δ* gestört sein. Eine entsprechende Ko-IP von Rpl25p-myc mit Mex67p-GFP in Wildtyp und *np13Δ* wurde RNase A insensitiv bestätigt. Diese Interaktion wird in *np13Δ* jedoch nicht geschwächt (Daten Thomas Gross und Heike Krebber). Somit scheint Npl3p nicht als Adapterprotein für Mex67p im Transportprozess der großen ribosomalen Untereinheit zu wirken. Npl3p könnte auch als unabhängiger Export-Faktor agieren, der z.B. über eine Direktinteraktion mit den Nukleoporin assoziierten Proteinen den Exportprozess unterstützt. Mlp1p assoziiert mit intranukleären Filamenten und über Nup60p mit dem Kernporenkomplex. Es stellt somit die Verbindung zwischen Zellkernplasma und den Kernporen-Komplexen her (Strambio-de-Castilla *et al.*, 1999). Es wurde eine Interaktion zwischen Npl3p und Mlp1p in An- und Abwesenheit von einer RNase A Behandlung analysiert (Abb. 24). In der durchgeführten Mlp1p-TAP Ko-IP konnte deutlich eine RNase A insensitive Interaktion und damit eine physikalische Interaktion mit dem endogenen Npl3p nachgewiesen werden (Abb. 24, Spur 8 u. 10). Npl3p könnte somit auch als unabhängiger Export-Faktor der ribosomalen prä-60S Untereinheit in einer Direktinteraktion mit dem Kernporenkomplex assoziierten Mlp1p den Transport der großen ribosomalen Untereinheit unterstützen.

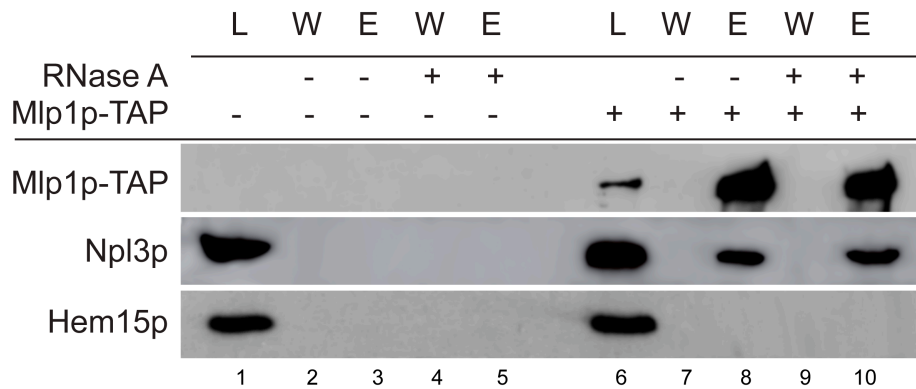


Abb. 24: Physikalische Interaktion von Mlp1p mit Npl3p *in vivo*. Für die Positivkontrolle wurde ein endogen getaggtter Mlp1p-TAP-Stamm (Spur 6-10) und für die Negativkontrolle ein isogener Wildtyp-Stamm (Spur 1-5) verwendet. Die Mlp1p-TAP Immunopräzipitation erfolgte unter Verwendung von IgG-Sepharose „Beads“ und Zelllysaten logarithmischer Wachstumsphase. Nach der Ko-IP erfolgte die Proteinauftrennung im Gradienten-Gel (12%/9%/6%). Die Anwesenheit von ko-präzipitiertem Npl3p erfolgte mittels Detektion mit einem α -Npl3-Antikörper. Mlp1p-TAP wurde über einen α -PAB (Protein A Bindeprotein)-Antikörper nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde Hem15p mit einem α -Hem15-Antikörper detektiert.

Ein weiterer komplexer Vorgang ist die zytoplasmatische Zusammenführung von mRNA, 40S und 60S Untereinheiten zur Bildung des katalytisch aktiven Ribosoms im sog. „subunit joining“ Prozess (Einleitung 1.4). Um weitere Hinweise für eine aktive Rolle von Npl3p in der Translation zu sammeln, erfolgte daher eine vergleichende Wachstumsanalyse des *npl3Δ* mit verschiedenen Mutanten der Ribosomen Biogenese und assoziierten Prozessen in Gegenwart des Translationsinhibitors Cycloheximid, einem Glutarimid-Antibiotikum. Cycloheximid verhindert die Bindung der Aminoacyl-tRNA an die Ribosomen über Aktivitätshemmung der Peptidyltransferase und inhibiert damit sowohl die Translationsinitiation als auch die Translationselongation. Für diese Analysen wurden Vollmedium-Agarplatten mit verschiedenen Cycloheximid-Konzentrationen versetzt (Abb. 25). Es erfolgte eine Wachstumsanalyse von *npl3Δ*-Zellen im Vergleich mit dem Wildtyp bei 25°C. Des weiteren wurden mutierte Faktoren analysiert, die wichtig für das ribosomale „subunit joining“ (*rpl10-G161D*, *fun12Δ*), für den nukleären prä-60S Export (*nmd3-2*, *mtr2-33*, *arx1Δ*) und für den mRNA Export (*mtr2-21*, *rat7-1*) sind. Diese mutierten Faktoren können auf verschiedenen Ebenen den Translationsprozess schwächen (Abb. 25). Darüberhinaus enthalten etwa 72% aller ribosomalen Proteine Introns in ihrer Sequenz. Daher können auch Spleißing-Defekte die Expression der ribosomalen Gene, die wichtiger Bestandteil der Ribosomen sind, beeinträchtigen und somit sekundär zu Störungen in der Translation führen (Ares *et al.*, 1999). Bei einer bereits sehr niedrigen Cycloheximid Konzentration von 0,04 μ g/mL ist *npl3Δ* nicht mehr überlebensfähig. Diese Letalität kann in ähnlicher Weise auch für die Deletion von *FUN12* beobachtet werden, nicht jedoch für die anderen analysierten Mutanten. *FUN12* katalysiert die Bildung der ribosomalen 80S

Komplexe („subunit joining“) unter GTP Hydrolyse (Searfoss *et al.*, 2001, Pestova *et al.*, 2000; Shin *et al.*, 2009). *Rpl10-G161D* ist ebenfalls eine Mutante, die den „subunit joining“ Vorgang durch seine Assoziation mit der prä-60S Untereinheit im Zytoplasma unterstützt und die starke synthetische Wachstumsdefekte in Gegenwart von Cycloheximid (Abb. 25). Interessanterweise gibt es zwei verschiedene *MTR2*-Mutanten, die zum einen zu prä-60S Export Defekten (*mtr2-33*) und zum anderen zu mRNA Export-Defekten (*mtr2-21*) führen (Bassler *et al.*, 2001). Die prä-60S Export-Mutante *mtr2-33* zeigt leichte Wachstumssensitivitäten in Anwesenheit von Cycloheximid (0,06 µg/mL). Die anderen prä-60S Exportfaktor-Mutanten *nmd3-2* und *arx1Δ* zeigen keine signifikanten Wachstumsdefekte im Vergleich mit dem Wildtyp. Ebenso weisen die mRNA Export-defekten Mutanten *mtr2-21* und *rat7-1* kein verändertes Wachstum in Anwesenheit des Inhibitors auf.

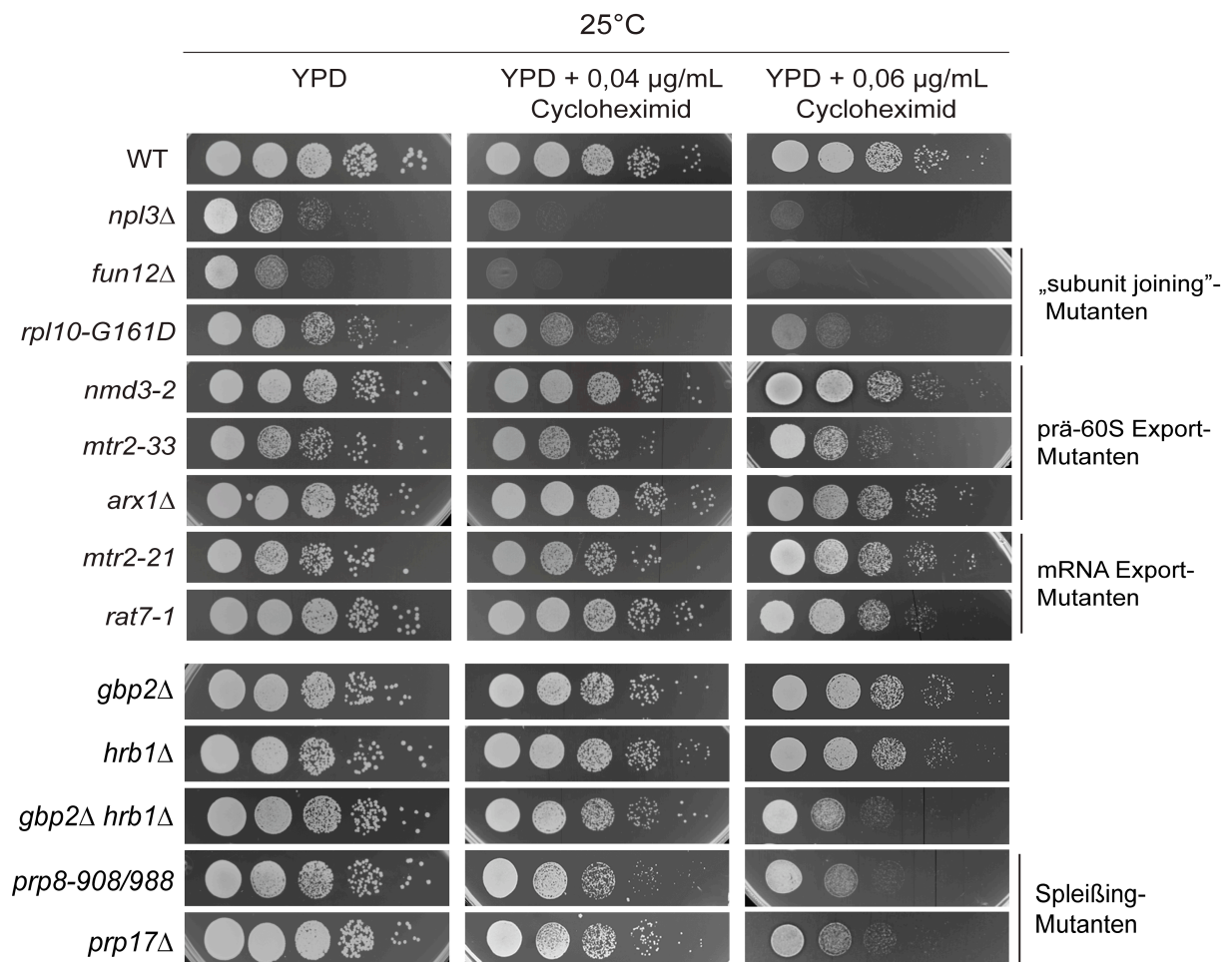


Abb. 25: Synthetische Wachstumsdefekte von *npl3Δ* in Anwesenheit des Translationsinhibitors Cycloheximid. YPD-Medium wurde mit verschiedenen Cycloheximid-Konzentrationen versetzt (0,04 und 0,06 µg/ml). In seriellen 1:10 Zellverdünungen wurden die angegebene Stämme auf YPD- und Cycloheximid-haltigen YPD-Festmedium-Platten getropft und für 3 Tage bei 25°C inkubiert.

Die *NPL3* verwandten SR-ähnlichen Proteine *GBP2* oder *HRB1* zeigen in ihrer Deletion keine synthetischen Wachstumsdefekte in Anwesenheit des Translationsinhibitors und

unterscheiden sich damit klar von *NPL3*. Leicht verminderte Wachstumsraten werden jedoch in der Deletionskombination aus *gbp2Δ hrb1Δ* sichtbar. Ebenso führen Spleißing-Mutanten zu vergleichbaren verminderten Wachstumsraten. Diese könnten auf sekundäre Effekte durch ein fehlerhaftes Intron-Spleißen ribosomaler Protein Gene zurückzuführen sein.

Die beobachteten starken synthetischen Wachstumsdefekte von *np13Δ*, vergleichbar mit Mutanten, die einen „subunit joining“ Defekt hervorrufen, deuten neben einer Funktion als Export-Faktor für die prä-60S Untereinheit auch auf eine potentielle weiterführende Funktion im Translationsgeschehen hin.

Abschließend kann festgehalten werden, dass die hier gezeigten Daten zu einer neu entdeckten Funktion von Npl3p im Exportprozess der präribosomalen 60S Untereinheit sowie in der Translation beitrugen. Eine *NPL3* Deletion führt zu Export-Defekten der prä-60S nicht jedoch der 40S Untereinheit im Zellkern. Npl3p interagiert physikalisch mit der ribosomalen Untereinheit im Beispiel des früh assemblierenden Rpl25p der prä-60S Untereinheit und mit dem rRNA Element 25S rRNA *in vivo*. Eine weitere *in vivo* Assoziation mit der 35S rRNA gibt Hinweise auf eine bereits früh erfolgende Interaktion von Npl3p mit dem prä-90S Ribosom. Npl3p interagiert als Bestandteil des nukleären prä-60S Export kompetenten Komplexes sowohl mit Nmd3p als auch mit Mex67p. Npl3p übernimmt jedoch nicht die Funktion des Adapters für die Assoziation des Export-Faktors Nmd3p mit der ribosomalen prä-60S-Untereinheit. Eine Funktion als unabhängiger prä-60S Export-Faktor ist über eine Direktinteraktion mit Mlp1p möglich, welches über Nup60p mit dem Kernporen-Komplex assoziiert ist.

3.2 Die SR-ähnlichen Proteine Gbp2p und Hrb1p vermitteln den nukleären Export von gespleißten mRNAs

3.2.1 Gbp2p, Hrb1p und Npl3p sind Export-Adapter für den Export-Rezeptor Mex67p

Generelles Ziel der Arbeitsgruppe AG Krebber ist es, ein besseres Verständnis für die nukleären Exporteigenschaften von SR-ähnlichen mRNA Bindeproteinen zu gewinnen. Während und nach der RNA Polymerase II mediatisierten Transkription der DNA in heterogene nukleäre RNA (hnRNA), erfolgt die Interaktion mit einer Vielzahl von mRNA-Bindeproteinen. Sie spielen eine Rolle bei der Transkriptionselongation, der Ausbildung einer 5'-Kappenstruktur („Capping“), dem prä-mRNA Spleißen, der posttranskriptionalen 3'-Endprozessierung und Polyadenylierung oder sie koordinieren die Rekrutierung des Export-Komplexes. Gbp2p und Hrb1p sind als mRNA Bindeproteine bekannt, die mRNA assoziiert kontinuierlich zwischen Zellkern und Zytoplasma hin- und herpendeln. Ihre molekulare Funktion im mRNA Export ist bislang noch nicht eindeutig charakterisiert (1.7.5).

Ein essentieller Schlüsselfaktor des Export-Komplexes ist das pendelnde Rezeptor-Heterodimer Mex67p-Mtr2p. Nach derzeitigem Modell kontaktiert Mex67p die Export-kompetenten mRNP-Komplexe über eine physikalische Interaktion mit dem SR-ähnlichen Protein Npl3p und Yra1p, wobei letzteres kein Pendelprotein darstellt (Segref *et al.*, 1997; Kohler & Hurt, 2007; Zenklusen *et al.*, 2001, Reed & Hurt, 2002). Mtr2p ist diejenige Rezeptorkomponente, die den Kontakt mit den Kernporen-Komplexen über eine Interaktion mit FG-reichen Sequenzen der Nukleoporene herstellt (Conti & Izaurralde, 2001). In dieser Arbeit wurde untersucht, ob neben Npl3p auch die verwandten SR-ähnlichen mRNA Bindeproteine Gbp2p und Hrb1p mit Mex67p physikalisch interagieren. In myc-Ko-IP Studien wurden Gbp2p und Hrb1p als genomisch C-terminal getaggte myc-Fusionsproteine sowie das Plasmid-kodierte myc-Npl3p immunopräzipitiert. Mex67p als potentieller Interaktionspartner wurde als GFP-getaggtes Protein, Plasmid kodiert, in die entsprechenden Stämme eingebracht. Präzipitierte myc-Proteine und ko-präzipitiertes Mex67p-GFP wurden im Western-Blot-Verfahren und entsprechenden Immunodekorationen nachgewiesen (Abb. 26, A, B u. C). Für Npl3p konnte im Sinne einer Positivkontrolle eine physikalische Interaktion sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von RNase A festgestellt werden (Abb. 26, A, Spur 8 u. 10). Eine Direktinteraktion von Gbp2p-myc mit Mex67p-GFP ist ebenfalls als RNase A insensitiv zu charakterisieren und kennzeichnet damit eine direkte Interaktion mit dem Export-Rezeptor, die nicht über RNA Moleküle vermittelt wird (Abb. 26, B, Spur 8 u. 10). Hrb1p interagiert ebenfalls mit dem Export-Rezeptor (Abb. 26, C, Spur 8 u. 10). In Anwesenheit des Enzyms RNase A verringert sich die Interaktionsstärke mit Mex67p um ca. $12\% \pm 3\%$, womit eine marginale RNase A Sensitivität für diese Interaktion zu kennzeichnen

ist (Abb. 26, C, Spur 10). Neben Npl3p fungieren somit nicht nur Npl3p, sondern auch Gbp2p und Hrb1p als Export-Adaptoren für den Export-Rezeptor Mex67p *in vivo*.

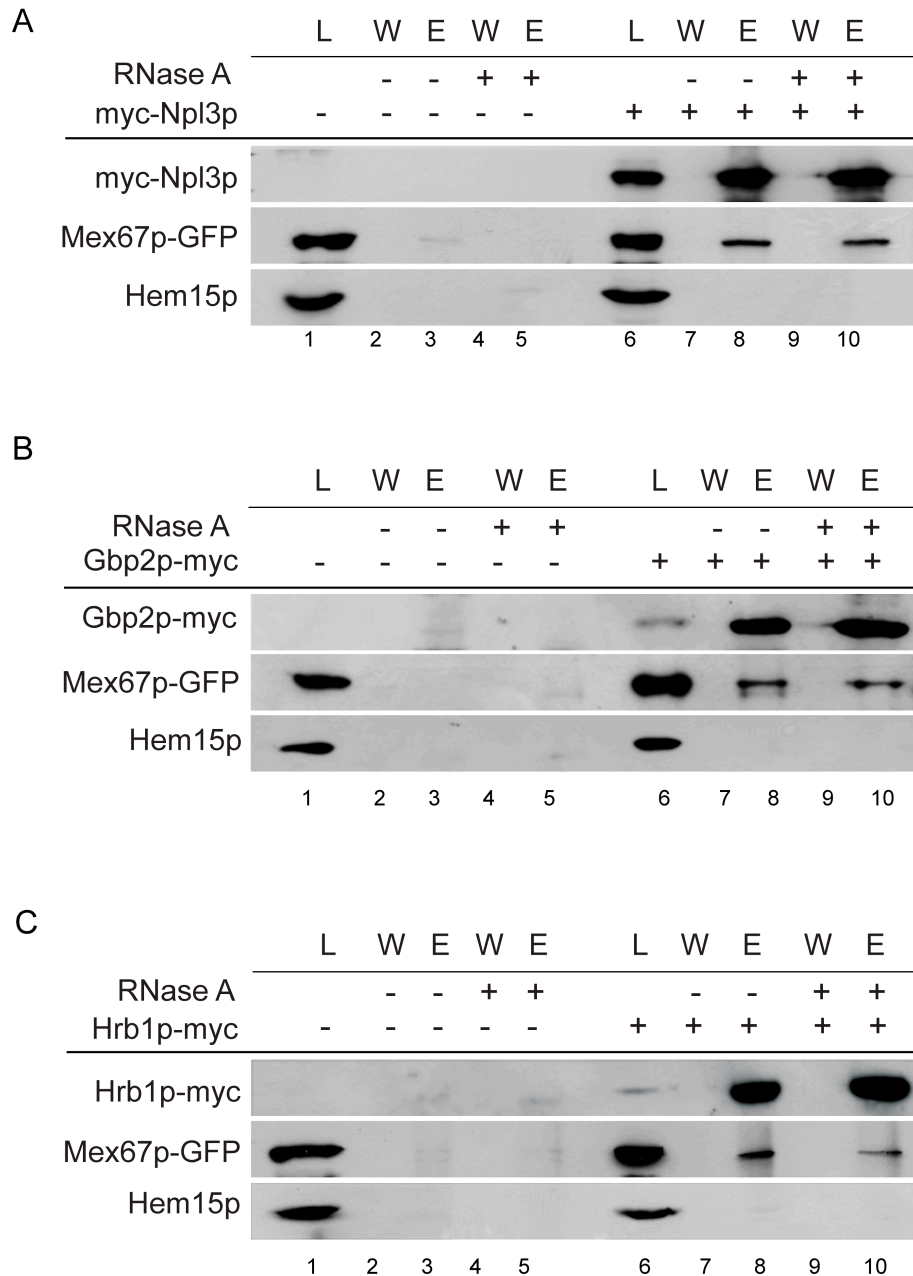


Abb. 26: Physikalische Interaktion von Mex67p mit Npl3p, Gbp2p und Hrb1p *in vivo*. Ko-Immunopräzipitationen der myc-getaggtten SR-ähnlichen Proteine zur Analyse einer Mex67p-GFP Direktinteraktion. A/B/C) Für die Positivkontrollen (Spur 6-10) wurden Wildtypzellen bzw. genomisch myc getaggte Gbp2p und Hrb1p Stämme mit Mex67p-GFP transformiert. Für die vergleichende Analyse einer Interaktion von Npl3p und Mex67p wurden Wildtypzellen mit Plasmid-kodiertem myc-Npl3p und Mex67p-GFP transformiert. Lysate aus Zellen der Dichte $2,5 \times 10^7$ Zellen/ml wurden gewonnen und entsprechenden SR-ähnlichen Proteine mit Hilfe des α -myc-Antikörpers gebunden. Der Antikörper-Protein Komplex wurde über Protein G Plus Agarose präzipitiert. Nach fünfmaligem Waschen und Eluat wurde nach SDS-PAGE (11%) und Western Blot Analyse die Präsenz des ko-präzipitierten Mex67p-GFP analysiert. Der Nachweis der getaggtten Proteine erfolgte mit α -myc-9E10 und α -GFP-Antikörpern. Hem15p wurde mit einem α -Hem15 Antikörper analysiert. Die Berechnung der Signalstärken erfolgte mit Hilfe des Computer-Programms ImageJ. L = Lysat; W = 5. Waschschrift; E = Eluat

3.2.2 Genetische Interaktionen zwischen den SR-ähnlichen Proteinen *NPL3*, *GBP2* und *HRB1*

Werden alle drei SR-ähnlichen mRNA Bindeproteine deletiert, so führt dies zur synthetischen Letalität (Abb. 27). Sowohl die Einzeldelationen *gbp2Δ* und *hrb1Δ* als auch die Doppel-Deletion aus *gbp2Δ hrb1Δ* zeigen im Vergleich zum isogenen Wildtyp kein vermindertes Wachstum. Eine *NPL3*-Deletion führt im Gegensatz zu Deletionen von *GBP2* und *HRB1* zu Wachstumsdefekten (Abb. 27). Sehr starke synthetische Effekte sind in der *npl3Δ hrb1Δ* und insbesondere in der *npl3Δ gbp2Δ* Doppel-Deletion zu beobachten. Ein Wachstum bei der restriktiven Temperatur von 37°C bewirkt für *npl3Δ hrb1Δ* eine sehr starke Wachstumsreduktion nahe einer Letalität (Abb. 27). Die Zellen der *npl3Δ gbp2Δ* Deletionen sind hingegen bei 37°C nicht mehr überlebensfähig (Abb. 27). Diese genetischen Interaktionen schließen auf redundante Funktionen der SR-ähnlichen mRNA Bindeproteine, die möglicherweise die Export-Adapterfunktion betreffen.

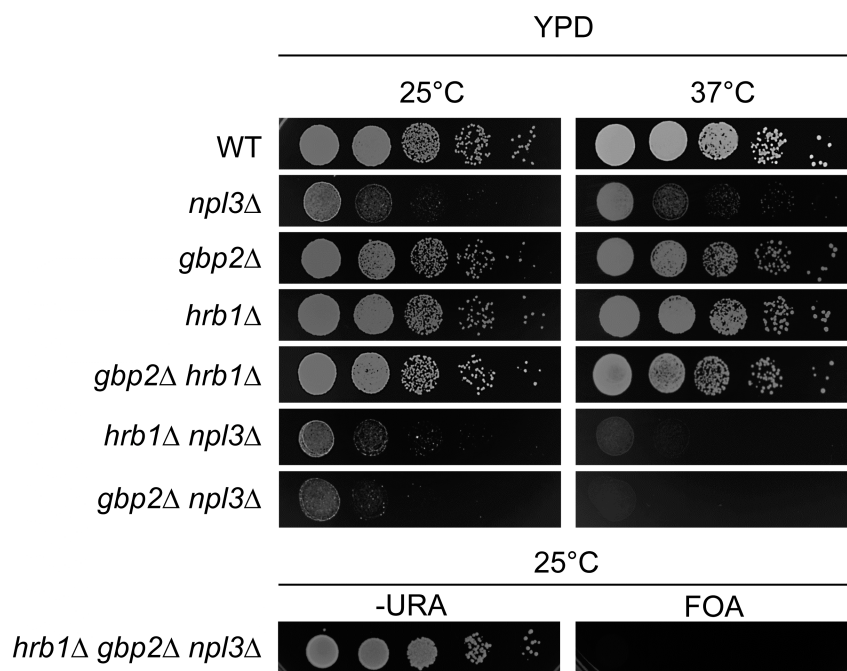


Abb. 27: Wachstumsanalyse serieller Zellverdünnungen von *npl3Δ*, *gbp2Δ* und *hrb1Δ* sowie entsprechenden Doppel-Deletionen und der Triple-Deletion im Vergleich mit dem korrespondierenden Wildtyp im BY4741-Stammhintergrund. Für den Wachstumstest wurden identische Zellmengen beginnend mit 1×10^7 und nachfolgenden 1:10 Verdünnungsschritten auf Agar-Vollmedium getropft und für 3 Tage bei 25°C und 37°C inkubiert. Für die Triple-Deletion, die mit einem Plasmid kodierenden *NPL3*, *URA3*, *CEN* transformiert wurde, erfolgte eine Wachstumsanalyse auf -URA und FOA Platten bei 25°C. Auf FOA-Agarplatten wird auf den Verlust des URA-Plasmides selektioniert (2.8.2).

Da eine *NPL3* Deletion zu einem verringerten Zellwachstum führt, wurde in einem nächsten Schritt analysiert, ob eine Überexpression von Gbp2p oder Hrb1p den Wachstumsdefekt wiederherstellen kann. In der Analyse wurden 2μ („high copy“)-Plasmide verwendet, die vor dem *GBP2*, *HRB1* bzw. *NPL3*-Gen einen vorgeschalteten *GAL1* Promoter aufweisen. Diese Plasmide wurden in den *np13Δ*-Deletionsstamm eingebracht und entsprechende Zellen in seriellen Verdünnungen auf Galaktose-haltigen –URA– sowie auf FOA-Agarplatten aufgetropft (Abb. 28). Während das eingebrachte P_{GAL1} -*NPL3* Plasmidkonstrukt den Wachstumsdefekt etwa auf Wildtyp Niveau wiederherstellen kann, führt eine *HRB1* Überexpression sogar zu verstärkten Wachstumsdefekten. Ein verbessertes Wachstum für *np13Δ* wird hingegen durch eine Gbp2p Überexpression erzielt, die den genetischen Zusammenhang dieser Faktoren unterstreicht. Dennoch erreicht diese Wachstumsrate nicht das wildtypische Wachstumsniveau, was wiederum auf keine vollständige Funktionsüberlappung dieser beiden Faktoren hindeutet.

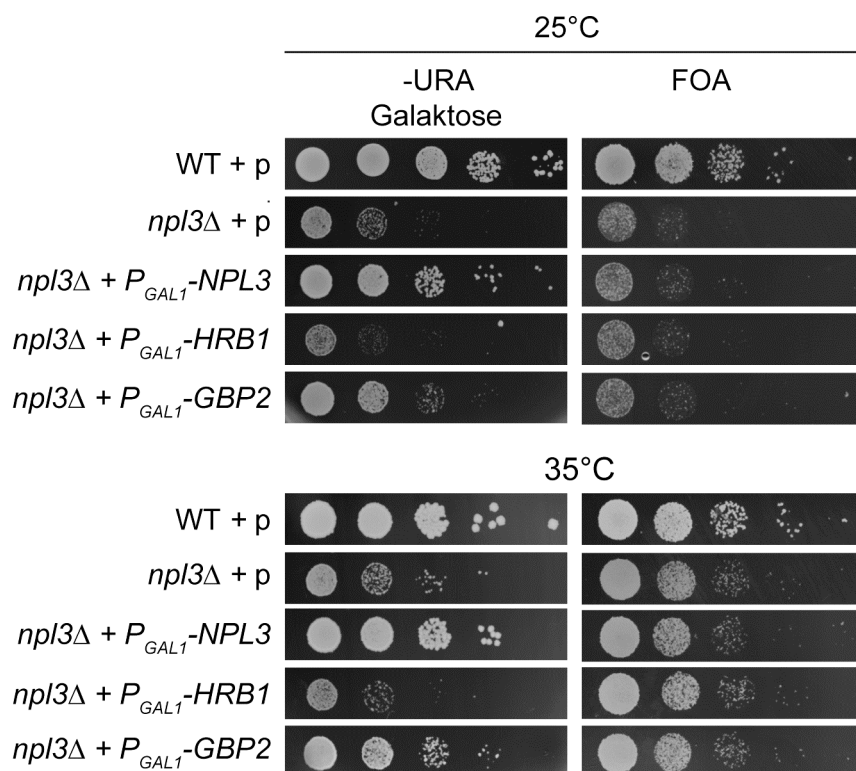


Abb. 28: Eine Überexpression von *GBP2* stellt den Wachstumsdefekt von *np13Δ* partiell wieder her. Für die Wachstumsanalyse wurde der Deletionsstamm *np13Δ* mit P_{GAL1} -*NPL3*, P_{GAL1} -*GBP2* oder P_{GAL1} -*HRB1* 2μ , *URA3*-Plasmiden transformiert. Als Wachstumsreferenz wurde ein Wildtyp-Stamm mit integriertem Leervektor mitgeführt. Die entsprechenden Stämme wurden in seriellen Zellverdünnungen auf Galaktose-haltigen –URA und FOA Agarplatten getropft und bei 25°C und 35°C für 4 Tage inkubiert.

3.2.3 Identifizierung neuer Export-relevanter Faktoren für die SR-ähnlichen Proteine

Der essentielle Export-Rezeptor Mex67p zeigte erstaunlicherweise in Microarray basierten mRNA Bindungsanalysen, dass nur ein Anteil von ca. 20% des gesamten mRNA Pools gebunden wird (Hieronymus & Silver, 2003). Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, dass möglicherweise noch weitere bisher nicht identifizierte mRNA Export-Rezeptoren in der Zelle existieren. Um die Möglichkeit zu nutzen neue Export-Faktoren zu entdecken, wurde eine Export-„Screen“ etabliert. Alle drei GFP-getaggtten SR-ähnlichen mRNA Bindeproteine weisen in GFP-Lokalisationsstudien eine nukleäre Zellverteilung auf (Häcker & Krebber, 2004). Diese im Fließgleichgewicht vorhandene dominierende nukleäre Anreicherung der SR-ähnlichen Proteine beruht auf einen langsameren mRNA assoziierten Export, während der Reimport der SR-ähnlichen Proteine zurück in den Zellkern schneller erfolgt. Eine Identifizierung von Faktoren, die den mRNA assoziierten Export der SR-ähnlichen Proteine beeinflussen, wird daher erschwert. Um potentielle neue Export-Rezeptoren oder aber neue Faktoren zu entdecken, die den Export dieser Proteine beeinflussen, wurde ein genetisch-optischer „Export-Screen“ mit Hilfe von zytoplasmatischen Versionen der SR-ähnlichen Proteine durchgeführt. Für die Herstellung dieser zytoplasmatischen Konstrukte wurde die Erkennungs- und Bindungsdomäne des Importrezeptors Mtr10p, die sich innerhalb der SR-Domäne befindet, zielgerichtet mutiert (Windgassen *et al.*, 2003; Gilbert *et al.*, 2001). Die Mutation bewirkt eine Schwächung der Importrezeptor Bindung, die zu einem ineffizienteren Reimport führt (Abb. 29). Bei der GFP getaggtten zytoplasmatischen Gbp2p-Version führt ein Austausch von Serin gegen Alanin an Position 15 (gbp2_cp-GFP) zur zytoplasmatischen Anreicherung. In der GFP-Mikroskopie zeigen die Zellen somit eine gleichmäßige Verteilung im Zellkern und Zytoplasma. Eine Substitution von Arginin gegen Alanin des achten RS-Dipeptids in der SR-Domäne von Npl3p führt ebenso zu einer gleichmäßigen Zellverteilung (Gilbert *et al.*, 2001; Abb. 29). mRNA Bindung und Export-Funktion sind dabei nicht beeinträchtigt. Im Fall von Hrb1p wurde der Galaktose induzierbare Promoter *GAL1* vor dem Gen kloniert (Häcker & Krebber, 2003). Mit Hilfe einer Galaktose Induktion kann somit eine Hrb1p-Überexpression bewerkstelligt werden. Diese Überexpression führt zur Absättigung des Importrezeptors, so dass über den zytoplasmatischen Rückstau ebenso eine gleichmäßige Proteinverteilung in beiden Kompartimenten vorgerufen werden (Abb. 29).

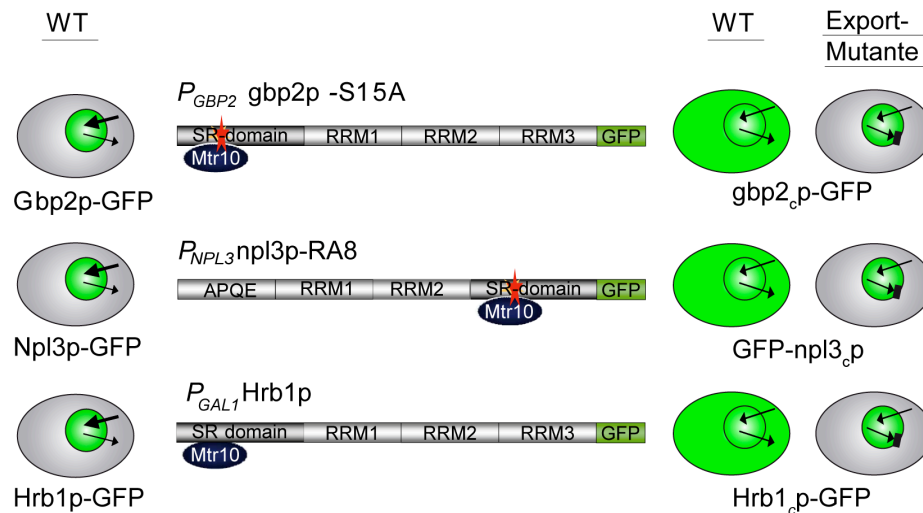


Abb. 29: Schematische Darstellung der zytoplasmatischen Konstrukte der SR-ähnlichen mRNA Bindeproteine (Modell nach Heike Krebber). Die Aminosäuren-Substitution S15→A in der SR-ähnlichen Domäne von Gbp2p, die die Bindungsdomäne für den Importrezeptor Mtr10p umfasst, führt zu einer ineffizienteren Rezeptor Bindung. Diese führt zu einer verlangsamten Importrate, die eine zytoplasmatische Gbp2p Verteilung möglich macht (gbp2_cp-GFP). Nach dem gleichen Prinzip erfolgte ein Austausch des achten RS-Dipeptids R→A in der SR-Domäne von Npl3p (npl3_cp-GFP) (Gilbert *et al.*, 2001). Eine Galaktose induzierte Überexpression von Hrb1p bewirkt eine Übersättigung der Importkapazität von Mtr10p, so dass diese einen zytoplasmatischen Hrb1p Rückstau hervorruft (Hrb1_cp-GFP).

Der Export „Screen“ wurde initial mit gbp2_cp-GFP begonnen (Abb. 30). Ein mit dem Plasmid kodierten gbp2_cp-GFP transformierter Wildtyp-Stamm wurde einer Ethylmethansulfonat (EMS)-Mutagenese für ungerichtete Punktmutationsereignisse unterzogen. Mutierte Zellen wurden anschließend über einen temperatursensitiven (ts) Phänotyp bei 37°C selektioniert (Sabine Häcker, Thomas Gross und Heike Krebber). Anschließend wurden die ts-Mutanten sukzessive in der GFP-Mikroskopie auf gbp2_cp-GFP Export-Defekte hin untersucht. Mutanten, die für gbp2_cp-GFP eine nukleäre Akkumulation bei 37°C zeigten, wurden schließlich mit Genbibliotheken transformiert, um das mutierte Gen über Komplementation zu identifizieren. Die dabei verwendete „Rose-Library“, eine *CEN-URA*-Bibliothek, besteht aus restringierten genomischen *S. cerevisiae* DNA-Abschnitten, die in präparativen Saccharose Gradienten der Größe nach fraktioniert wurden. Verschiedene Größenklassen der Hefe-DNA wurden in den *CEN*, *URA3* Ycp50 Vektor ligiert und ergaben 14 unabhängige „Plasmid-Pools“ (Rose *et al.*, 1987).

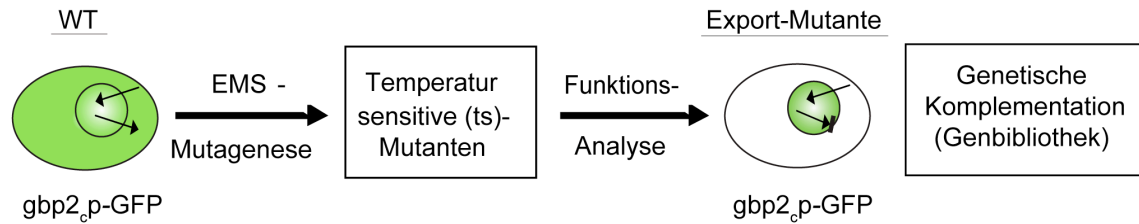


Abb. 30: Strategie des Export-„Screens“. Nach erfolgter EMS-Mutagenese wurden die ts-Phänotypen herausselektioniert und im Funktionstest auf einen gbp2_c-GFP Export-Defekt hin untersucht. Schließlich erfolgte die genetische Komplementation des mutierten Gens über Transformation von Genbibliotheken.

Tabelle 5: Identifizierte Temperatur-sensitive (ts)-Mutanten im Export-„Screen“. Die aus dem „Screen“ hervorgegangenen gbp2_c-GFP Export-defekten ts-Mutanten wurden zur Identifizierung des mutierten Gens mit Genbibliotheken transformiert. Nach Isolierung des Wachstums-wiederherstellenden Plasmids der Genbibliothek, erfolgte dessen Sequenzierung und Genkartierung.

| Ts-Mutante | Mutiertes Gen | Molekulare Funktion |
|------------|---------------|--|
| Ts5 | <i>PRP17</i> | Spleißing |
| Ts113 | <i>SPT15</i> | TATA Bindeprotein für die RNA-Polymerase I, II und III vermittelte Transkription |
| Ts142 | <i>SPT15</i> | TATA Bindeprotein für die RNA-Polymerase I, II und III vermittelte Transkription |
| Ts153 | <i>PRP8</i> | Spleißing |

Die in dieser Arbeit verwendeten und analysierten Export-defekten ts-Einzelmutanten sind in der Tabelle 5 aufgeführt. Generell wurden in bisherigen Analysen der Arbeitsgruppe keine potentiellen neuen mRNA Export-Rezeptoren gefunden, wohl aber nukleäre Faktoren, die wichtig sind für die Genexpression und deren Prozessierung und somit den Export-Prozess indirekt beeinflussen. In zwei Fällen wurden mutierte Spleißing-Faktoren identifiziert. Dabei handelt es sich um ts153/*prp8* (im Export-„Screen“ identifiziert von Melanie Janning und Heike Krebber) und ts5 (Tab. 5). Im Falle der ts5-Mutante wurden nach Komplementation mit einem Genbibliotheken-Plasmid, dessen Isolierung und Sequenzierung ein Fragment mit den kodierenden ORF's für *tk(CUU)D1*, *SEM1* und *PRP17* identifiziert. Die Verifizierung für eine Mutation, die in dem Gen *PRP17* vorliegt, erfolgte über eine Kreuzung mit einem *PRP17* Deletionsstamm. Die *PRP17*-Deletion ist nicht essentiell, jedoch wie auch die ts5-Mutante letal bei 37°C. Die beiden Stämme aus ts5-Mutante und *prp17*Δ wurden miteinander gekreuzt und die Diploidenformation Marker-spezifisch selektioniert. Die Wachstumsanalyse zeigte anschließend, dass eine genetische Kombination dieser Mutanten bei 37°C letal ist

(Abb. 31). Würde es sich bei der *ts5*-Mutante um eine Mutation in einem anderen Gen als *PRP17* handeln, so würde der *ts*-Effekt bei 37°C aufgehoben werden, da dieser durch das jeweilige wildtypische Allel ausgeglichen wird.

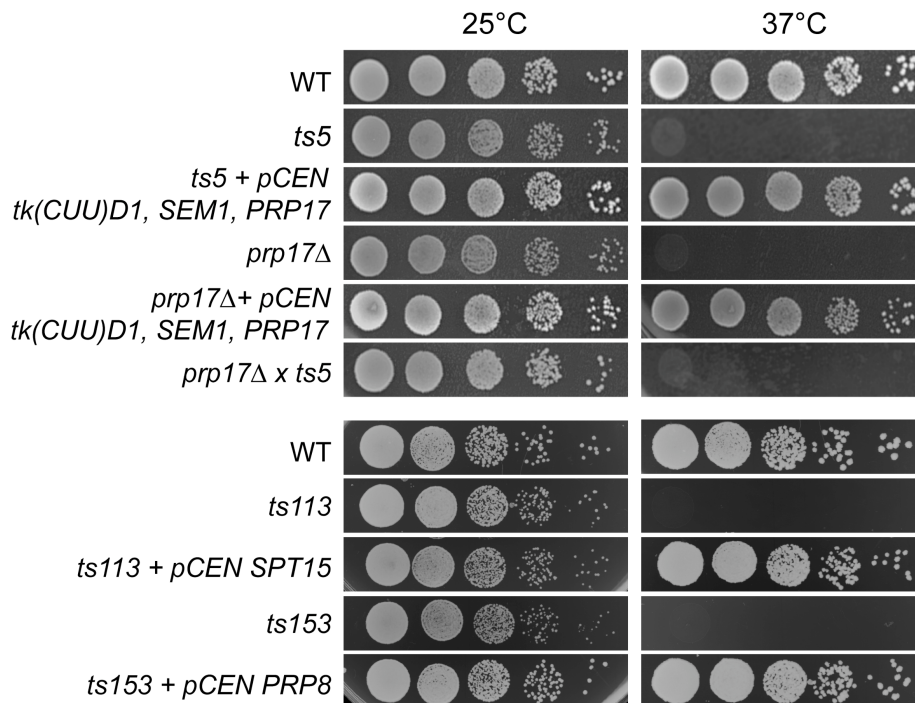


Abb. 31: Wachstumsanalyse zur Verifizierung von *PRP17*, *SPT15* und *PRP8* als mutierte Gene in *ts5*, *ts113* und *ts153*. Die *ts5*-Mutante wurde mit dem Wachstums-komplementierenden Plasmid *tk(CUU)D1*, *SEM1*, *PRP17* einer Genbibliothek transformiert. Eine genetische Kombination der *ts5*-Mutante und *prp17Δ*-Nullmutante wurde über eine Kreuzung dieser haploiden Stämme erhalten. Die *ts113*- und *ts153*-Mutanten wurden mit Plasmiden, die für *SPT15* bzw. *PRP8* kodieren, transformiert. Die resultierenden Stämme wurden bei 25°C und 37°C für 3 Tage auf YPD-Festmedium inkubiert.

Ts-Mutanten, die einen Export-Defekt für *gbp2_c*-GFP anzeigten, wurden ebenfalls auf Export-Defekte für *Hrb1_c*-GFP und *GFP-npl3_c* hin analysiert, um so eine vergleichende Studie der Export-Eigenschaften aller drei SR-ähnlichen Proteine durchzuführen (Abb. 32). Für die *ts5/prp17*-Mutante wurde ein starker Export-Defekt für *gbp2_c*-GFP nachgewiesen (Abb. 32, A). *Hrb1_c*-GFP weist ebenfalls eine nukleäre Anreicherung im Vergleich zum Wildtyp auf, die jedoch weniger stark ausfällt als für *gbp2_c*-GFP (Abb. 32, B). Interessanterweise zeigt *GFP-npl3_c* weiterhin eine gleichmäßige Verteilung in beiden Kompartimenten auf, so wie sie auch in Wildtyp zu sehen ist (Abb. 32, C). Eine gleichartige Auswirkung auf den Export von *gbp2_c*-GFP und *Hrb1_c*-GFP kann auch in der Spleißing-Mutante *ts153/prp8* festgestellt werden (Abb. 32, A u. B). *gbp2_c*-GFP weist eine sehr starke Akkumulation im Zellkern auf, die nahezu vergleichbar ist mit dem durch *rat7-1* hervorgerufenen generellen mRNA Export-Defekt (Abb. 32, A). *Hrb1_c*-GFP zeigt in der *ts153/prp8* Mutante ebenfalls einen partiellen Export-Defekt (Abb. 32, B). *GFP-npl3_c*-GFP

bleibt hingegen in seiner zellulären Verteilung unverändert wie auch in der Spleißingmutante *ts5/prp17* (Abb. 32, C).

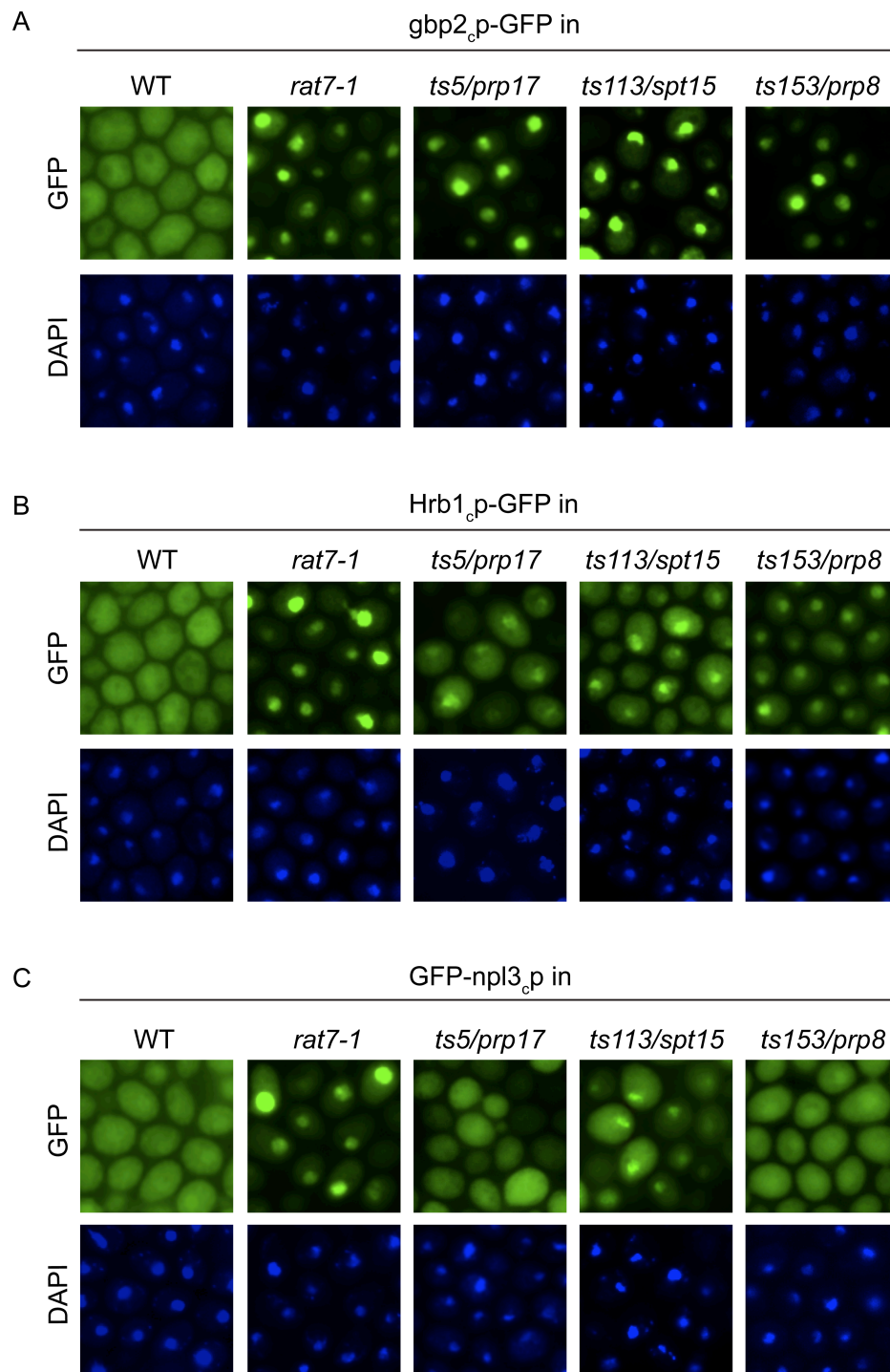


Abb. 32: Im Export-Screen identifizierte Mutanten, die zu Export-Defekten von SR-ähnlichen mRNA Bindeproteinen führen. WT, *rat7-1*-, *prp17*-, *spt15*- oder *prp8*-Zellen wurden mit den Plasmid kodierten zytoplasmatischen Versionen von *gbp2_c*-p-GFP, *Hrb1_c*-p-GFP und GFP-npl3_c transformiert. Die resultierenden Zellen wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase bei 25°C kultiviert und anschließend für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden mit Formaldehyd fixiert und die zelluläre Verteilung von *gbp2_c*-p-GFP, *Hrb1_c*-p-GFP und GFP-npl3_c in der GFP-Mikroskopie analysiert.

Damit wird eine Differenzierung der Exporteigenschaften innerhalb der SR-ähnlichen Proteingruppe deutlich. Während gbp2_c-GFP und Hrb1_c-GFP in Spleißingfaktor Mutanten in ihrem Export blockiert sind und sich daher nukleär anreichern, bleibt GFP-npl3_c in seiner zellulären Exportfunktion unbeeinflusst.

Eine weitere identifizierte ts-Mutante, ts113, kodiert für eine *spt15*-Mutante. *SPT15* ist ein TATA-Bindeprotein, das für die Transkription durch RNA-Polymerasen I, II und III benötigt wird (Cormack *et al.*, 1992). Alle drei SR-ähnlichen mRNA Bindeproteine sind in dieser Mutante im Zellkern mislokalisiert, da sie in Assoziation mit der synthetisierten mRNA den Zellkern verlassen (Abb. 32, A, B u. C). Die *spt15*-Mutante tauchte im Export-„Screen“ ein zweites Mal in Form der ts142-Mutante auf, die über eine Komplementationsgruppen-Analyse identifiziert wurde (Tab. 5). Diese Analyse erfolgte über eine Kreuzung der beiden ts-Mutanten untereinander. Nach der Kreuzung der Mutantenstämme erfolgte die Selektion der Diploiden. Wachsen diese diploiden Stämme bei 37°C, während die haploiden Stämme sterben, so liegen die über Kreuzung zusammengebrachten Mutationen auf unterschiedlichen Gen-Allelen und können sich gegenseitig komplementieren. Sind auch die Diploiden bei 37°C letal, so betreffen die Mutationen die Allele desselben Gens, wie hier im Fall von ts113 und ts142.

3.2.3 Spleißingfaktor Mutanten führen zu Export-Defekten von Gbp2p und Hrb1p

Die neu identifizierten Spleißing Mutanten wurden in ihrer Genmutation genauer analysiert. Nach gDNA-Isolierung erfolgte die Amplifikation des jeweiligen Gens in ~ 1kb Schritten mittels „Proof reading“ *PfuTurbo* DNA Polymerase. Das Amplifikat wurde zur Bestimmung der Punktmutationen sequenziert. Die Mutation im betreffenden Gen galt als bestätigt, wenn diese dreimal in der Sequenzierungsreaktion unabhängiger Amplifikationsreaktionen bestätigt wurde. Innerhalb der 2413 AS-Sequenz des Prp8p führt eine erste Punktmutation zu einem Aminosäureaustausch an Position 908 von Aspartat zu Tyrosin (D908→Y) (Abb. 33, A). Eine zweite Mutation wurde 240 Basenpaare stromabwärts identifiziert. An dieser Position kommt es zu einem Aminosäuren-Austausch von Glutamat zu Lysin (E988→K). Die Mutationen befinden sich in einem hoch konservierten Bereich vor dem RNA Erkennungsmotiv (RRM) (Abb. 33, A). In dieser Sequenzregion sind weitere Mutationen (P986T, Y923C und E942G) bekannt, die Suppressionseffekte für Mutanten des zweiten Spleißing-Schrittes zeigten (Grainger & Beggs, 2005; Konforti & Konarska, 1994; Frank *et al.*, 1992). Die Sequenzierungen der *prp17* Mutante führten zur Entdeckung eines durch eine Punktmutation hervorgerufenen vorzeitigen Stopkodons an Position AS 336 (*prp17*Q336*)

(Abb. 33, B). Es fehlen die C-terminalen letzten 119 Aminosäuren. In dieser Region befinden sich mehrere G β -Motive auch WD-„repeats“ genannt, die wichtig sind für Protein-Protein Wechselwirkungen (Lyndsey-Boltz *et al.*, 2000).

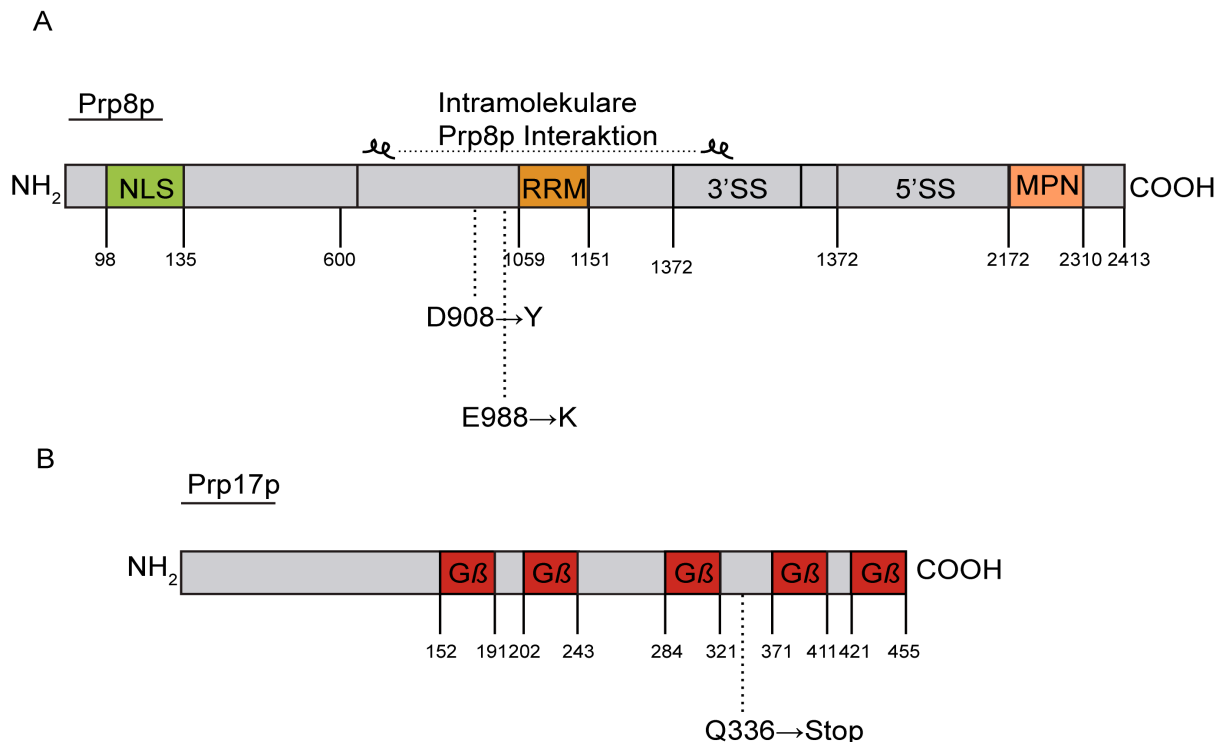


Abb. 33: Funktionelle Domänenstruktur von A) Prp8p und B) Prp17p und identifizierte Aminosäuren-Substitutionen der im Export-„Screen“ identifizierten Mutanten. Schematische Darstellung der Domänen nach Grainger & Beggs, 2005, PROSITE und Pfam Datenbanken. A) Identifizierte Domänen von Prp8p sind ein N-terminales nukleäres Lokalisationssignal („nuclear localization signal“ = NLS), eine RNA Bindedomäne (RRM) und Sequenzregionen (3'SS und 5' SS), die die Interaktion des Proteins mit der 3' und 5' Spleißstelle der mRNA unterstützen. Die C-terminale MPN-Domäne mit dem Konsensus-Motiv H-x-Q-x[7]-S-xx-D ist vermutlich wichtig für die Interaktion mit potentiellen Bindungspartnern (Grainger & Beggs, 2005; Zhang *et al.*, 2007). B) In der Sequenz des Proteins Prp17p sind fünf WD Dipeptid Wiederholungen innerhalb von G β -Motiven, die mittels PROSITE und Pfam Auswertung identifiziert wurden. G β -Motive bestehen aus zwei unterschiedlichen Regionen. N-terminal wird innerhalb des Motifs eine aus etwa 20 Aminosäuren bestehende amphipathische α -Helix gebildet, die gefolgt wird von einer Region aus WD-Wiederholungsmotiven („WD-repeat“). Die WD Wiederholungen bestehen zumeist aus konservierten Glycin(G)-Hystidin(H)- und Tryptophan(W)-Aspartat(D)-Tandems (Ben-Yehuda *et al.*, 2002).

Da im Export-Screen zwei verschiedene Spleißingmutanten identifiziert worden sind und eine interessante Differenzierung vorliegt durch vorhandene Export-Defekte für Gbp2p und Hrb1p nicht jedoch für Npl3p, wurde dieser Sachverhalt näher untersucht. Eine Verbindung von Gbp2p und Hrb1p mit dem Spleißingprozess ist bislang noch nicht beschrieben worden. Der Spleißingprozess gliedert sich in zwei aufeinanderfolgenden Transesterifizierungsreaktionen, in welcher jeweils ein nukleophiler Angriff einer OH-Gruppe auf eine Phosphodiesterbindung erfolgt. Im ersten katalytischen Spleißing-Schritt attackiert das sogenannte „branch-point“ Adenosin (Polypyrimidin-Trakt) mit seiner OH-Gruppe die 5'-

Spleißstelle und bewirkt damit die Freisetzung des 5'-Exons und die Zirkularisierung des Introns (Lariat-Struktur). Die 3' OH-Gruppe des 5' Exons greift dann im zweiten Spleißing Schritt die Bindung der 3' Spleißstelle an. Dies führt zur Verknüpfung der beiden Exons und der Freisetzung des Intron-Lariats. Npl3p wurde vor kurzem eine unterstützende Funktion der ko-transkriptionalen Rekrutierung von Spleißing Faktoren der Spleißing Frühphase zugeschrieben (Kress *et al.*, 2008). In dieser Publikation wurden u.a. genetische Interaktionen von *npl3Δ* mit Mutanten der Spleißingfaktoren *NAM8*, *LEA1* und *SNU66* gezeigt, die für *gbp2Δ* und *hrb1Δ* nicht gefunden wurden. Es wurde nach dieser Publikation ausgeschlossen, dass ein Zusammenhang von Gbp2p und Hrb1p mit Spleißingfaktoren der Frühphase besteht.

Das 280 kDa große Prp8p stellt eine spleißosomale U4/U6-U5 snRNP Kernkomponente dar, die im zweiten katalytischen 3'-Spleißing-Schritt involviert ist. Darüberhinaus ist Prp8p an spleißosomalen Umstrukturierungsprozessen beteiligt, die gleichermaßen die Erkennung von 5'- und 3'-Spleißstellen unterstützen. Die Funktion von Prp17p ist auf die Erkennung der 3'-Spleißstelle und deren katalytischen Transesterifizierung beschränkt. Zusammen mit *SLU7*, *PRP18* und *PRP16* bildet *PRP17* die Gruppe der Faktoren, die ausschließlich an der 3'-Spleißstellen Erkennung und katalytischen Spaltung involviert sind (Spleißing-Schritt II) (Umen & Guthrie, 1995). Um die These zu festigen, dass ein Export-Defekt von Gbp2p und Hrb1p nicht aber von Npl3p durch eine Blockierung bzw. Fehlfunktion in der Spleißing-Spätphase hervorgerufen wird, wurden die zytoplasmatischen SR-Protein GFP-Lokalisationsstudien auch in den ts-Mutanten *slu7-EIE* und *prp43-S247A* analysiert (Abb. 34). Prp43p ist beteiligt an der nach dem zweiten Spleißing-Schritt erfolgenden Intron-Lariat Freisetzung und Spleißosom Disassemblierung (Arenas & Abelson *et al.*, 1997; Martin, *et al.* 2002; Boon, *et al.* 2006). In der GFP-mikroskopischen Lokalisationsstudie ist zu erkennen, dass auch in *slu7-EIE* eine nukleäre Akkumulation für gbp2_cp-GFP und Hrb1_cp-GFP vorhanden ist. Auch in dieser Mutante kann keine veränderte Lokalisationsverteilung des GFP-npl3_cp beobachtet werden (Abb. 34, C). Diesem Muster folgt auch das Ergebnis der GFP-Lokalisationsstudie in *prp43-S247A*-Zellen (Abb. 34, D). Gbp2_cp-GFP und Hrb1_cp-GFP zeigen sehr starke Export-Defekte in allen Zellen. Die Verteilung von GFP-npl3_cp in *prp43-S247A*-Zellen ist in beiden Kompartimenten gleichmäßig verteilt und zeigt somit keinen Export-Defekt für dieses Protein an. Eine Lokalisationsstudie wurde zusätzlich in *prp17Δ* durchgeführt, die wie in *prp17Q336**-Zellen ein übereinstimmendes Ergebnis liefert (Abb. 34, A, B, C).

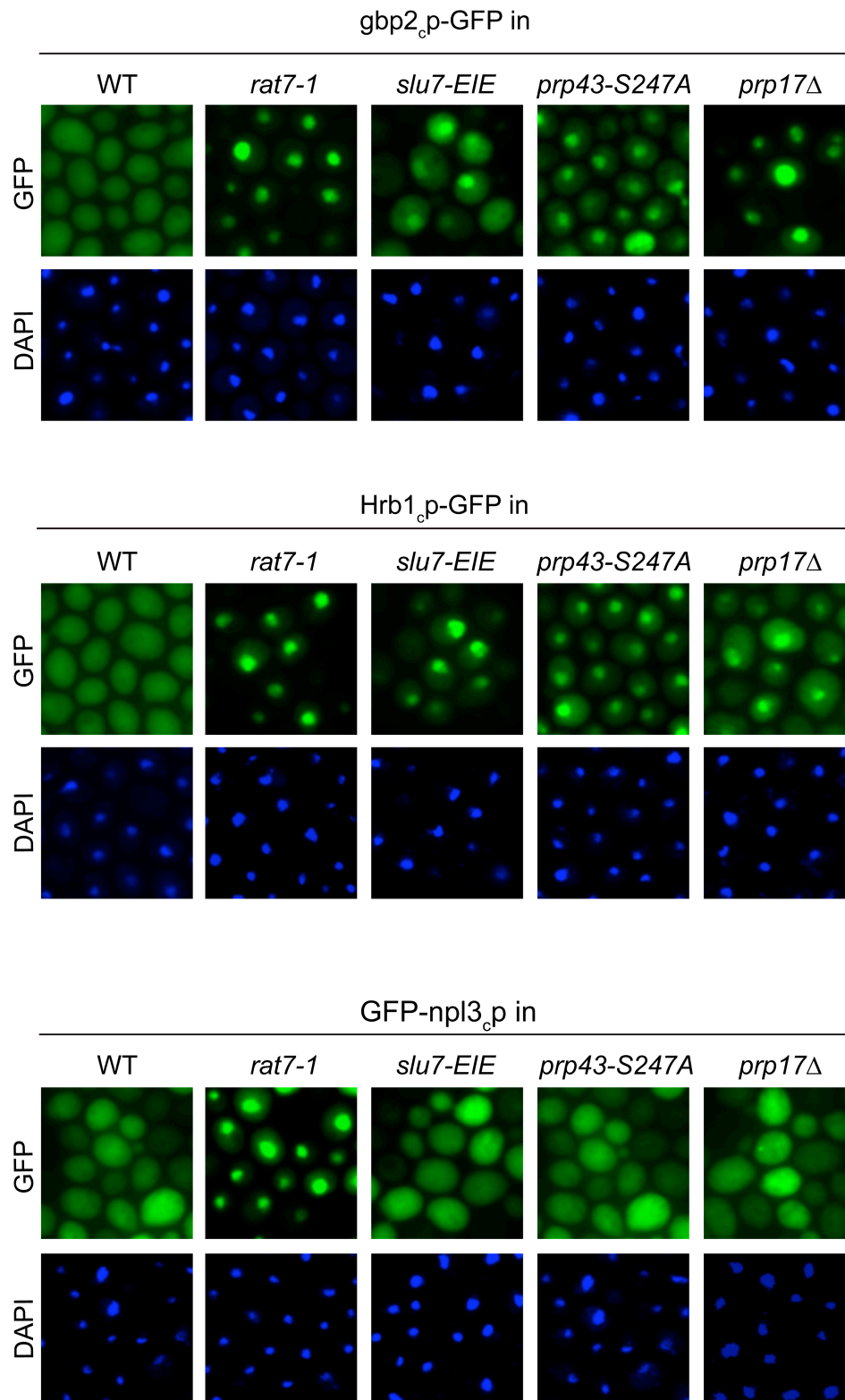


Abb. 34: Spleißing-Mutanten führen zu Export-Defekten für gbp2_cp-GFP und Hrb1_cp-GFP nicht jedoch für GFP-npl3_cp. . Die Plasmid kodierten zytoplasmatischen Versionen von A) gbp2_cp-GFP, B) Hrb1_cp-GFP und C) GFP-npl3_cp wurden in WT, *rat7-1*, *slu7-EIE*, *prp43-S247A* und *prp17Δ* über Transformation eingebracht. Die resultierenden Zellen wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase bei 25°C kultiviert bevor diese für 1 h bei 37°C inkubiert wurden. Die Zellen wurden anschließend mit Formaldehyd fixiert und das GFP-Signal im Mikroskop analysiert.

Um Hinweise dafür zu erhalten, ob die im Export-„Screen“ identifizierte *prp8-908/988*-Mutante den zweiten Spleißing Schritt beeinträchtigt, erfolgte eine Untersuchung auf genetische Interaktion mit *prp17Δ*. Eine *PRP8*-Mutante, z.B. *prp8-101*, die eine Blockierung der 3' Spleißstellen Erkennung bewirkt, ist synthetisch letal mit allen Mutanten aus *PRP17*, *SLU7*, *PRP16* und *PRP18*. Die Mutante *prp8-1* hingegen blockiert den initialen Spleißvorgang noch vor der ersten Spleißingreaktion. Diese Mutante zeigt keinerlei genetischen Interaktionen mit den vier genannten Spleißingfaktor Mutanten, die ausschließlich den zweiten Spleiß-Schritt katalysieren (Umen & Guthrie, 1995). Nach diesen Ergebnissen kann eine Wachstumsanalyse der miteinander gekreuzten Stämme *prp8-908/988* und *prp17Δ* Aufschluss über die funktionelle Bedeutung der im „Screen“ identifizierten *prp8-908/988* Mutante geben. Abbildung 35 zeigt deutlich, dass die genetische Kombination aus *prp17Δ* und *prp8-908/988* bei einer Temperatur von 30°C letal ist. Diese synthetischen Effekte lassen den Schluß zu, dass die *prp8-908/988* Mutante ebenfalls Einfluß auf den zweiten Spleißing-Schritt nimmt.

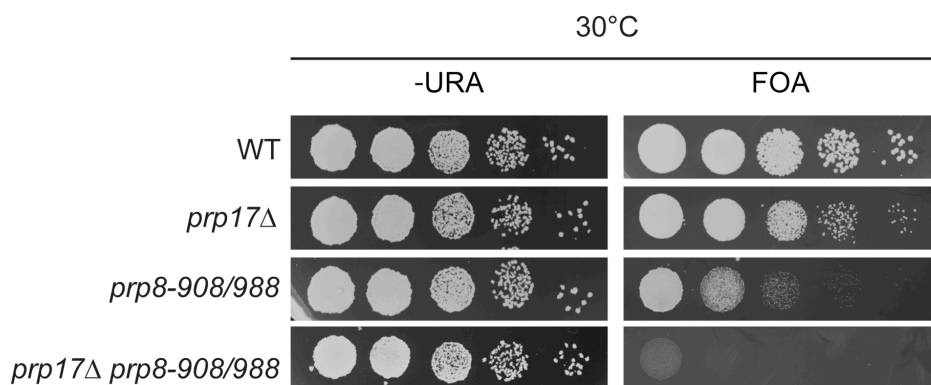


Abb. 35: Genetische Interaktion von *prp8-908/988* und *prp17Δ*. Für die Wachstumsanalyse wurden WT, *prp17Δ*, *prp8-908/988* und die Kombination *prp17Δ prp8-908/988* in seriellen Zellverdünnungen auf -URA und FOA-Agarplatten getropft. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 30°C für 3 Tage.

3.2.4 Genetische und physikalische Interaktionen von Gbp2p und Hrb1p mit Spleißingfaktor Mutanten

Um weitere Indizien für eine Verbindung von Gbp2p und Hrb1p mit dem Spleißingprozess zu finden, wurden genetische Interaktionsstudien durchgeführt. Sowohl die Einzeldelation der SR-ähnlichen Proteine als auch die Doppel-Deletion *gbp2Δ hrb1Δ* wurden mit *prp8-908/988*, *prp17Δ* und *prp43-S247A* gekreuzt und auf Wachstumsdefekte hin analysiert (Abb. 36). Die Temperatur sensitiven Spleißing-Mutanten weisen bei einer Inkubation bei 25°C eine zum Wildtyp vergleichbare Wachstumsrate auf (Abb. 36, A). Wie bereits gezeigt (Abb. 9), bewirkt eine *NPL3*-Deletion einer verminderte Wachstumsrate, die jedoch in einer Kombination mit

den jeweiligen Spleißingfaktor-Mutanten zu keinen additiven Wachstumsdefekten führt (Abb. 36, B).

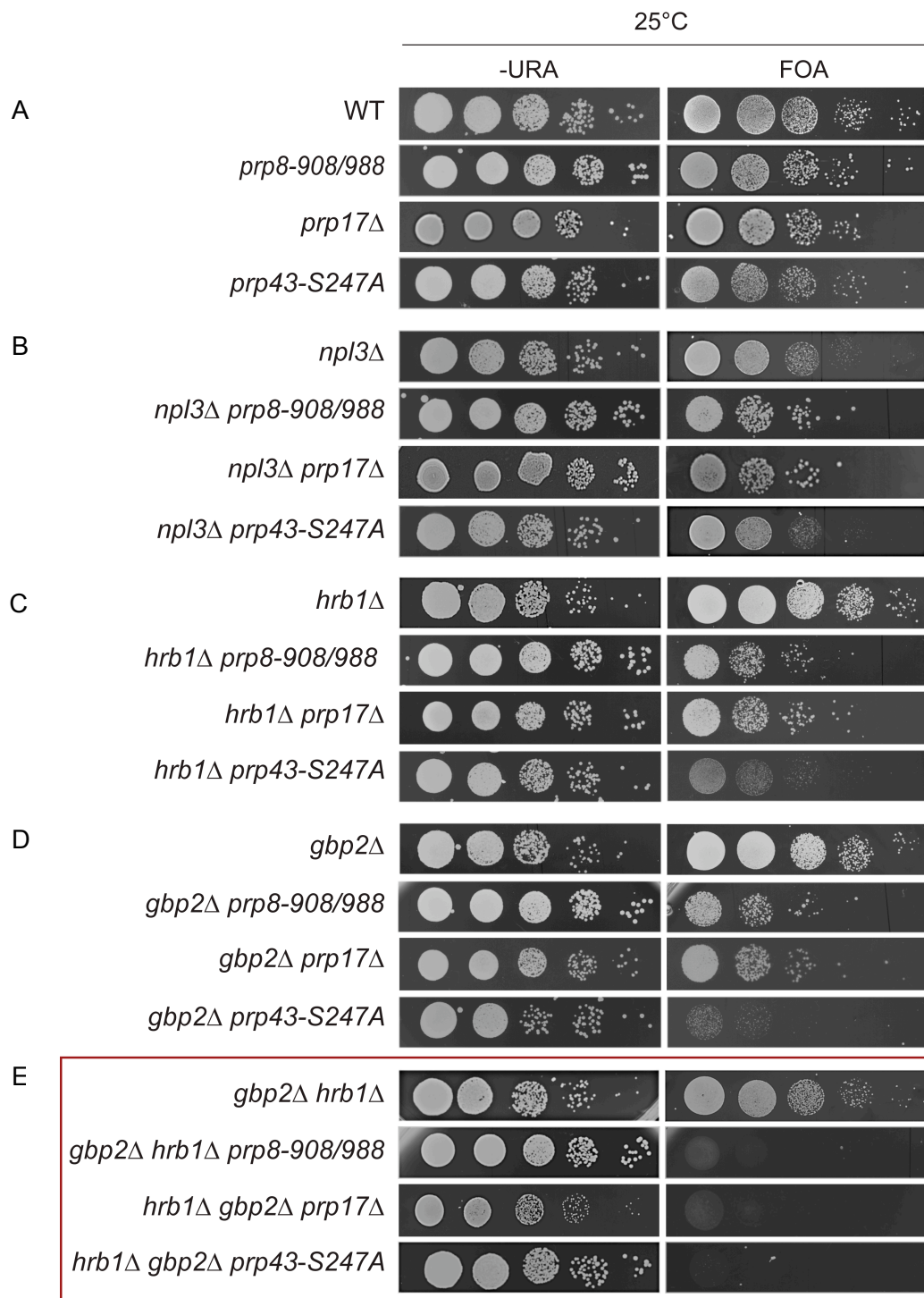


Abb. 36: Genetische Interaktionen von *gbp2Δ* und *hrb1Δ* mit den Spleißingfaktor-Mutanten *prp8-908/988*, *prp17Δ* und *prp43-S247A*. Als Wachstumsreferenz wurde ein Wildtyp-Stamm mit integriertem Leervektor mitgeführt. *npl3Δ*, *prp8-908/988* und *prp17Δ* wurden mit Plasmiden transformiert, die das jeweilige Wildtyp-Gen in sich tragen. Mit diesen Stämmen erfolgte die Durchführung der Kreuzungen mit den SR-ähnlichen Protein Deletionen. Alle angegebenen Stämme wurden auf -URA und FOA-Agarplatten in serieller Zellverdünnung aufgetropft. Die Inkubation erfolgte für 3 Tage bei 25°C.

Eine genetische Interaktion von *npl3Δ* mit den Spleißingfaktor-Mutanten der Spleißing Spätphase *prp8-908/988*, *prp17Δ* und *prp43-S247A* besteht demnach nicht.

Im Gegensatz dazu führt sowohl eine *HRB1*- als auch eine *GBP2*-Deletion in Kombination mit *prp8-908/988* oder *prp17Δ* zu etwa gleich starken Wachstumsdefekten (Abb. 36, C u. D). Entsprechende Kombinationen mit der *prp43-S247A*-Mutante bewirkt noch stärkere Wachstumsdefekte und zeigt damit die starken genetischen Interaktionen an. Diese sind für die Kombination *gbp2Δ prp43-S247A* besonders stark ausgeprägt (Abb. 36, C u. D). Bemerkenswert ist, dass die Tripel-Kombination aus *gbp2Δ hrb1Δ* mit allen drei jeweiligen Spleißingfaktor Mutanten zur synthetischen Letalität führt und damit die genetische Interaktion von *GBP2*, *HRB1* und den Mutanten der Spleißing Spätphase eindeutig anzeigt (Abb. 36, E).

Um eine Verbindung mit Spleißing Faktoren der Spleißphase II oder späteren Prozessen für Gbp2p, Hrb1p und Npl3p zu analysieren, wurden in dieser Arbeit Protein Interaktionen der myc-getaggten SR-Proteine mit GFP getaggttem Prp17p und TAP getaggtten Prp43p in Ko-IP Experimenten untersucht (Abb. 37, 38 und 39). Zunächst erfolgten Ko-IP Studien, in denen myc-getaggte Versionen von Gbp2p, Hrb1p und Npl3p immunopräzipitiert wurden und eine Ko-Präzipitation von Prp17p-GFP untersucht wurde (Abb. 37). Die Ko-IPs zeigen, dass eine starke physikalische Protein-Protein-Interaktion zwischen Gbp2p-myc und Prp17p-GFP besteht (Abb. 37, A, Spur 3 u. 5). Auch eine physikalische Interaktion zwischen Hrb1p-myc und Prp17p-GFP konnte bestätigt werden (Abb. 37, B, Spur 3 u. 5). Werden die Prp17p-GFP Signalstärken aus Gbp2p-myc und Hrb1p-myc Ko-IP miteinander verglichen, so wird deutlich, dass eine stärkere Bindung zwischen Gbp2p und Prp17p besteht als dies in der Interaktionsanalyse zwischen Hrb1p und Prp17p vorgefunden wurde. In der Gbp2p-myc Ko-IP kann für das ko-eluierende Prp17p-GFP eine stärkere Signalanreicherung im Vergleich zur Hrb1p-myc Ko-IP um etwa $31\% \pm 6\%$ (vgl. A: Spur 3 u. B: Spur 3) bzw. $40\% \pm 10\%$ (vgl. A: Spur 5 u. B: Spur 5) mit RNase Behandlung gemessen werden. Die Interaktionen beider SR-Proteine mit Prp17p-GFP sind im Wesentlichen als RNase A insensitiv und damit als RNA unabhängige physikalische Interaktionen zu bewerten. Eine Direktinteraktion von Npl3p-myc und Prp17p-GFP konnte hingegen nicht detektiert werden (Abb. 37, C).

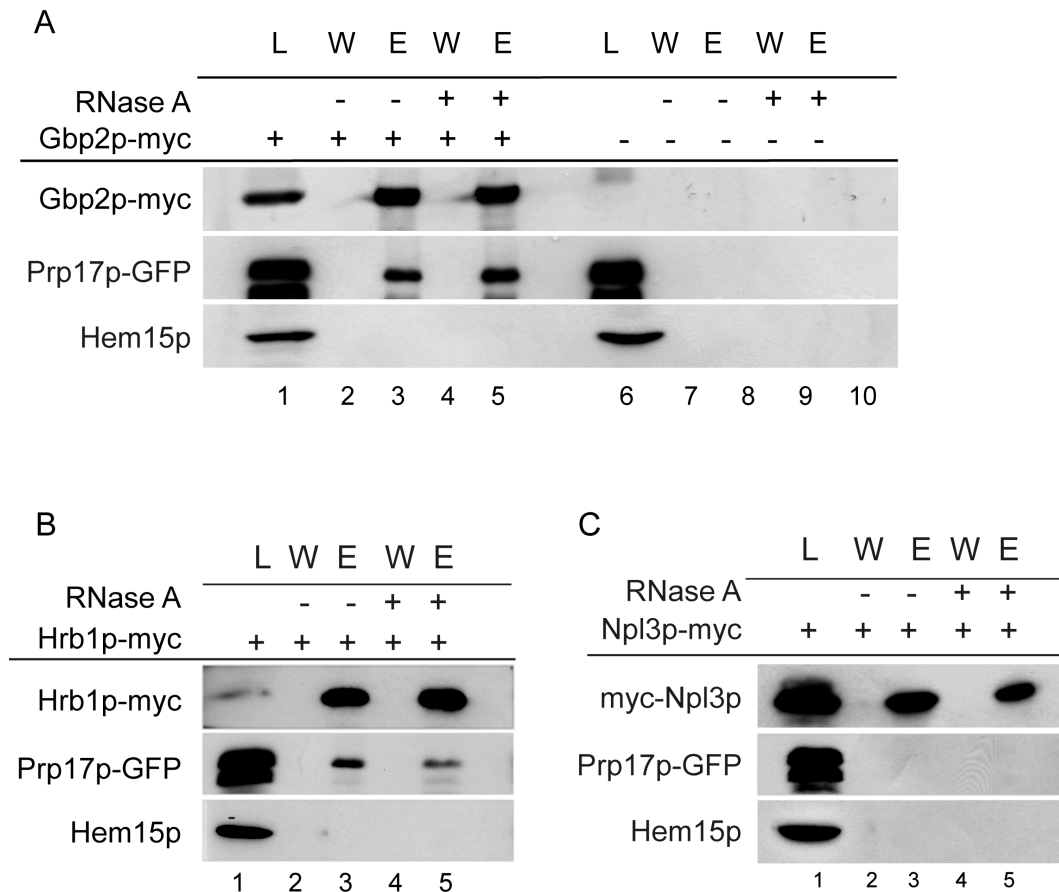


Abb. 37: Gbp2p und Hrb1p interagieren physikalisch mit dem Spleißingfaktor Prp17p *in vivo*. A u. B) Für die Positivkontrollen wurden Gbp2p-myc und Hrb1p-myc-Stämme jeweils mit Plasmid-kodiertem Prp17p-GFP transformiert. C) Für die Npl3p-Prp17p Interaktionsstudie wurde ein mit einem myc-Npl3p ausgestatteter Wildtyp ebenfalls mit dem Prp17p-GFP-Plasmid transformiert. Als Negativkontrolle wurde ein Wildtyp-Stamm, der das für Prp17p-GFP kodierende Plasmid in sich trägt, verwendet (A, Spur 6-10). Lysate aus Zellen der Dichte $2,5 \times 10^7$ Zellen/ml wurden hergestellt. In der folgenden Ko-Immunopräzipitation wurden die myc getagten SR-ähnlichen Proteine mit Hilfe des myc-9E10-Antikörpers an G-Sepharose „Beads“ für 3h gekoppelt. Nach fünf Waschschritten mit PBSKMT-Puffer wurden die „Beads“ als Eluatprobe direkt in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Neben Eluatprobe (E) wurden ebenfalls Lysat (L)- und 5. Waschschr.-Probe (W) in der SDS-Gelelektrophorese (11%) aufgetrennt und im Western-Blot analysiert. Potentiell ko-eluierendes Prp17p-GFP sowie präzipitiertes Gbp2p-myc, Hrb1p-myc und myc-Npl3p wurden mittels α -myc-9E10 und α -GFP-Antikörpern nachgewiesen. Als Ladekontrolle und zur Überprüfung unspezifische Bindungen, wurde Hem15p mit einem α -Hem15 Antikörper mitanalysiert. Die Berechnung von Western-Blot Signalstärken erfolgte mit Hilfe des Computer Programms ImageJ.

Die identifizierte Direktinteraktion zwischen den SR-ähnlichen Proteinen Gbp2p und Hrb1p mit Prp17p wurde im Vergleich auch in der Spleißingfaktor-Mutante *prp8-908/988* untersucht (Abb. 38). Damit sollte ein möglicher Einfluß dieser mutierten spleißosomalen Kernkomponente auf die identifizierten Interaktionen analysiert werden. Interessanterweise wird die Direktinteraktion von Gbp2p und Prp17p im *prp8-908/988* Stammhintergrund vollständig unterbunden (Abb. 35, A, Spur 13 u. 15). Auch die Hrb1p-Prp17p Direktinteraktion wird im *prp8-908/988* Stammhintergrund offenbar instabiler, da schwächere Signalstärken visualisiert werden konnten ($40\% \pm 5\%$ - RNase A, $24\% \pm 8\%$ + RNase A im

Vergleich zur jeweiligen Lysatsignalstärke; Differenzen aus präzipitierten myc-Signalen wurden angeglichen, Abb. 38, B, Spur 8 u. 10).

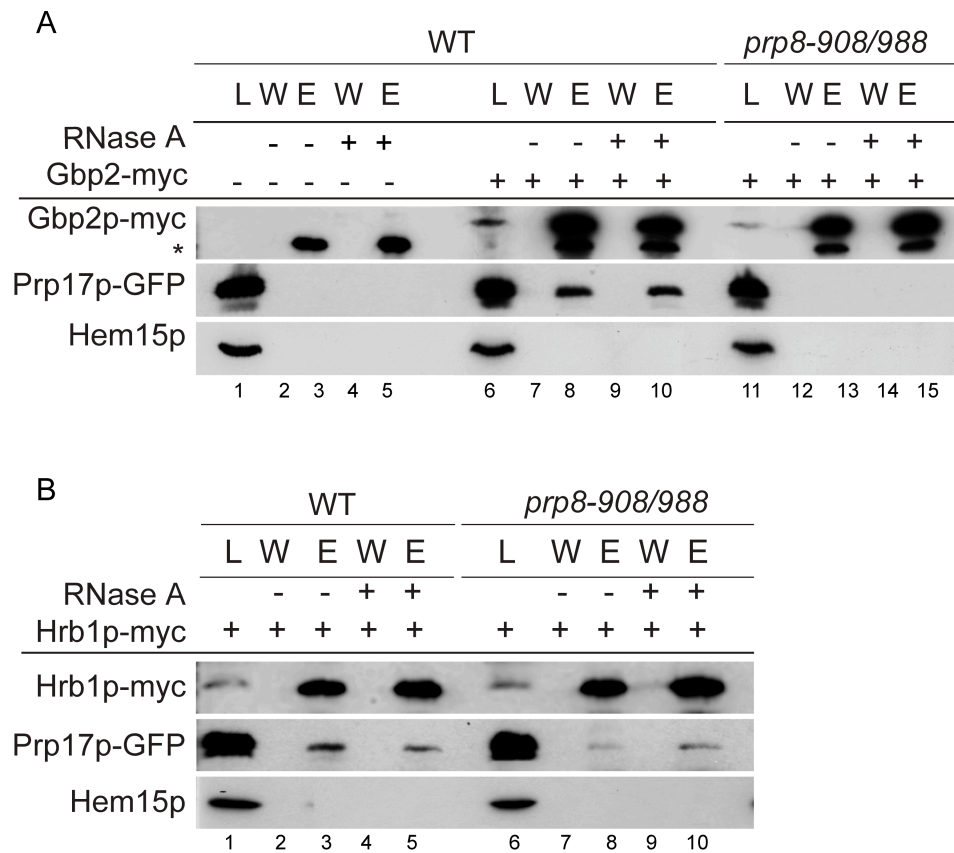
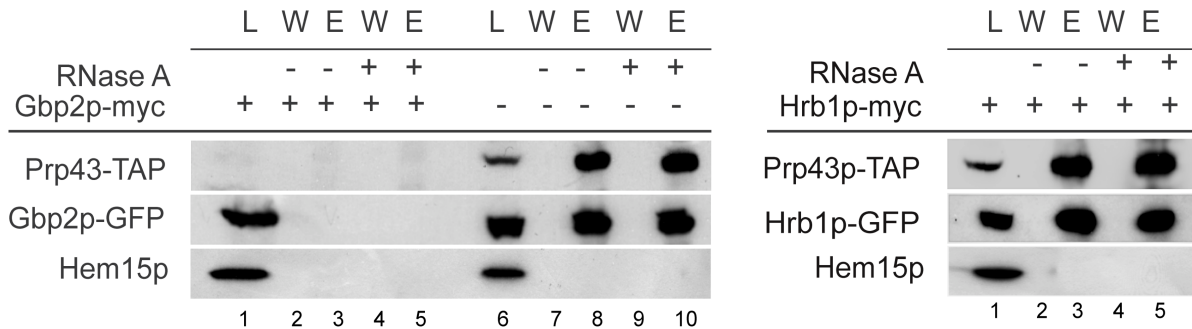


Abb. 38: Die physikalische Interaktion von Gbp2p und Hrb1p mit Prp17p wird im *prp8-908/988* Stammhintergrund gestört. Gbp2p-myc und Hrb1p-myc-Stämme sowie die genetische Kombinationen aus A) Gbp2p-myc *prp8-908/988* und b) Hrb1p-myc *prp8-908/988* wurden mit Plasmid-kodiertem Prp17p-GFP transformiert. Für die Analyse der Negativkontrolle erfolgte die Transformation des Wildtyps mit Prp17p-GFP (A, Spur 1-5). Lysate aus Zellen der Dichte $2,5 \times 10^7$ Zellen/ml wurden für die Anwendung einer myc-Ko-IP hergestellt. Die myc getaggten SR-ähnlichen Proteine wurden mit Hilfe des myc-9E10-Antikörpers an G-Sepharose „Beads“ für 3h gekoppelt. Myc und GFP getaggte Proteine wurden mit Hilfe des α -myc-9E10 oder α -GFP Anikörpers immunologisch nachgewiesen. Als Ladekontrolle und zur Überprüfung unspezifische Bindungen, wurde Hem15p mit einem α -Hem15 Antikörper mitanalysiert. Die Berechnung von Western-Blot Signalstärken wurde mit Hilfe von ImageJ berechnet. * Immunoglobulin-Bande (schwere Kette). Diese Bande wird je nach Laufstrecke der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine unterhalb der Gbp2-myc repräsentierenden Bande mit abgebildet.

Für eine weitere Interaktionsstudie mit Prp43p wurden Plasmid kodiertes Gbp2p-GFP oder Hrb1p-GFP in einen Prp43p-TAP-Stamm transformiert. In einer TAP-Ko-IP erfolgte der Nachweis von präzipitierendem Prp43p-TAP und kopräzipitierendem Gbp2p-GFP oder Hrb1p-GFP. Auch in diesen Experimenten konnte eine gleichermaßen starke physikalische Interaktion für beide SR-ähnlichen Proteine mit Prp43p-TAP nachgewiesen werden (Abb. 39, A). Eine Direktinteraktion von Npl3p mit Prp43p wurde in dieser Arbeit ebenfalls überprüft. Für die myc-Ko-IP Studien wurde ein Prp43p-TAP Stamm mit dem myc-Npl3p Plasmid

transformiert. In den Eluaten konnte nach myc-Ko-IP, Western-Blot und Immunodekoration kein Signal für ein ko-eluierendes Prp43p-TAP bestimmt werden (Abb. 39, B, Spur 8 u. 10). Diese Daten stimmen mit den Ergebnissen aus der Publikation Kress *et al.*, 2008 überein.

A



B

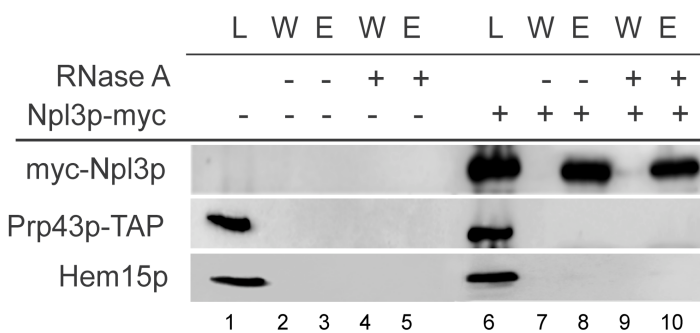


Abb. 39: Gbp2p und Hrb1p interagieren physikalisch mit dem Spleißingfaktor Prp43p *in vivo*.

A) Es erfolgte eine Prp43p-TAP Präzipitation zur Analyse von kopräzipitierenden Gbp2p-GFP und Hrb1p-GFP-Proteinen. Für die Positivkontrollen wurde der Prp43p-TAP-Stamm mit Plasmid kodierten Versionen von Gbp2p-GFP und Hrb1p-GFP transformiert. Als Negativkontrolle diente ein Wildtyp-Stamm, der mit Gbp2p-GFP transformiert worden war. B) Für die Npl3p-Prp43p Interaktionsstudie wurde ein mit einem myc-Npl3p-Plasmid ausgestatteter Prp43p-TAP Stamm als Positivkontrolle verwendet. Für die Negativkontrolle wurde der Prp43p-TAP-Stamm mit einem korrespondierenden Leervektor transformiert. Nach erfolgter myc-Ko-Immunopräzipitation erfolgte der immunologische Nachweis von präzipitiertem myc-Npl3p und Prp43p-TAP. Als Ladekontrolle und zur Überprüfung unspezifischer Bindungen, wurde Hem15p mit einem α -Hem15 Antikörper mitanalysiert. GFP-, myc und TAP-tags wurden mittels α -GFP, α -myc-9E10 und α -Protein A Bindeprotein (PAB)-Antikörpern nachgewiesen. Ko-Immunopräzipitationen wurden mit Lysaten aus einer $\sim 2,5 \times 10^7$ Zellkultur durchgeführt. Die Kopplung der Antikörper-Protein Komplexe erfolgte an G-Sepharose-„Beads“. In der TAP-Ko-Immunopräzipitation wurden IgG-Sepharose-„Beads“ angewendet.

Neben den identifizierten genetischen Interaktionen bestehen nach diesen gezeigten Ko-IP Studien auch direkte Protein-Protein-Wechselwirkungen von Gbp2p und Hrb1p mit dem im zweiten Spleißing-Schritt involvierten Faktor Prp17p. Gbp2p und Hrb1p interagieren physikalisch auch mit Prp43p, einem Faktor des postspleißosomalen Komplexes, der die Intron Freisetzung unterstützt und die finale spleißosomale Disassemblierung nach Abschluß des Intron-Spleißens initiiert.

3.2.4 Die synthetische Letalität von *skyΔ prp17Δ* wird über das Sky1p Substrat Gbp2p vermittelt

Seit einiger Zeit ist bekannt, dass die nicht essentielle spezifische Kinase *SKY1* der SR-ähnlichen Proteine Gbp2p, Hrb1p und Npl3p genetisch sowohl mit *prp8*-Mutanten als auch mit der *prp17Δ* Nullmutante, nicht jedoch mit *slu7*- oder *prp18*-Mutanten interagiert (Abb. 40; Dagher & Fu, 2001). Der Grund für diese genetische Interaktion ist bislang noch völlig unklar.

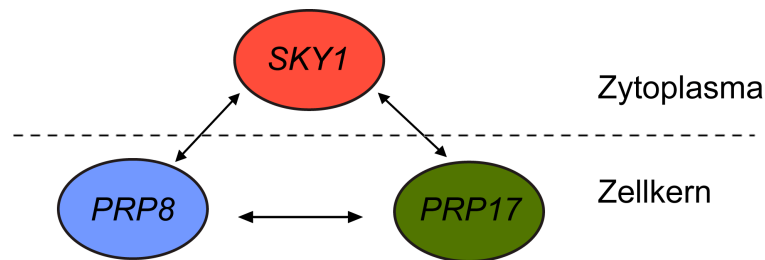


Abb. 40: Genetische Interaktionen zwischen *PRP8*, *SKY1* und *PRP17*.

Gbp2p, Hrb1p und Npl3p sind mit ihren SR-Domänen die potentiellen Substrate dieser zytoplasmatischen Kinase. Bisher ist gezeigt, dass eine mangelnde Phosphorylierung für Gbp2p einen starken Einfluß auf die Reimportrate nimmt (Windgassen *et al.*, 2003; Windgassen *et al.*, 2004). Im Vergleich zum Wildtyp führt das Fehlen dieser SR-Protein spezifischen Kinase *sky1Δ* zu einer sehr starken abnormalen zytoplasmatischen Anreicherung von Gbp2p-GFP, die in der GFP-Mikroskopie visualisiert wurde (Abb. 41, A; Windgassen *et al.*, 2003). GFP-Npl3p und Hrb1p-GFP zeigen hingegen in *sky1Δ*-Zellen anstelle der nukleären Lokalisation nur eine marginale zytoplasmatische Anreicherung (Abb. 41, A). Angesichts der bisher über biochemische, zellbiologische und genetische Studien gezeigten Verbindungen von Gbp2p und Hrb1p mit den Spleißingfaktoren Prp17p und Prp8p, stellt sich die Frage, ob die genetische Interaktion zwischen *skyΔ* und *prp17Δ* über die SR-spezifischen *SKY1* Substrate vermittelt wird. Eine Überexpression der SR-ähnlichen Proteine wurde daher auf potentielle Suppressionseffekte hin analysiert.

Zunächst wurden jedoch in der GFP-Mikroskopie vergleichende Lokalisationsstudien mit wildtypisch exprimierten und überexprimierten Npl3p, Hrb1p und Gbp2p-Proteinen in WT, *sky1Δ* und *rat7-1* durchgeführt. Für eine Überexpression der SR-ähnlichen Proteine wurden 2μ-Plasmide („high copy“) verwendet. Darüberhinaus ist vor dem entsprechenden Gen ein *GAL1*-Promoter vorgeschaltet, der durch Zugabe von Galaktose induziert und nach 1h durch Glukose reprimiert wurde. Eine Überexpression von Npl3p führt zu keinen signifikant veränderten Lokalisationsverteilungen im Vergleich zur wildtypisch exprimierten Npl3p Expression, die eine nukleäre Lokalisation zeigt. Eine Überexpression von Hrb1p-GFP

bewirkt hingegen eine Absättigung seines Importrezeptors Mtr10p, welche eine stärkere zytoplasmatische Verteilung in Wildtyp und in *sky1Δ* zur Folge hat (Abb. 41, B).

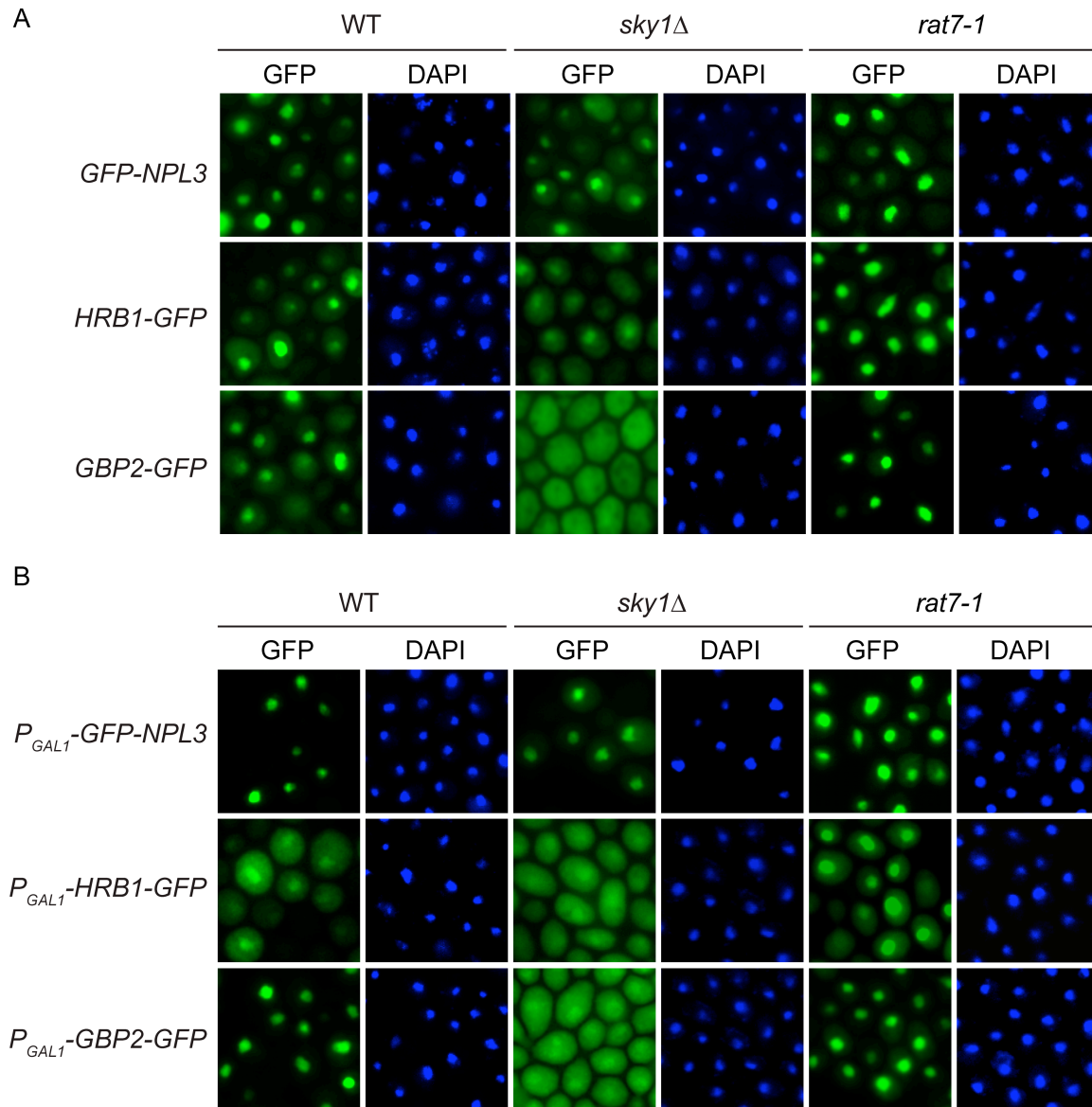


Abb. 41: Eine Deletion der zytoplasmatischen SR-spezifische Kinase *SKY1* bewirkt eine starke zytoplasmatische Mislokalisierung von Gbp2p. Eine Überexpression von Gbp2p kann die zytoplasmatische Anreicherung des Proteins verringern. WT, *sky1Δ* und *rat7-1*-Zellen wurden mit A) Npl3p-GFP, Hrb1p-GFP und Gbp2p-GFP *CEN*-Plasmiden transformiert oder B) mit 2μ („high copy“) Plasmiden, die das je unter der Kontrolle eines *GAL1*-Promoters stehende GFP-Npl3p, Hrb1p-GFP oder Gbp2p-GFP enthalten, transformiert. Die Kulturen wurden bei 25°C in Glukose-haltigem Selektivmedium bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase angezogen oder B) bei 25°C bis zum Erreichen einer logarithmischen Wachstumsphase in Raffinose-haltigem Selektivmedium angezogen. Es erfolgte die Induktion der GFP-Proteinexpression durch Zugabe von 2% Galaktose für 1h. Durch Zugabe von 2% Glukose wurde die Induktion nach 1h gestoppt. A und B) Anschließend erfolgte eine Inkubation der Zellen bei 37°C für 1h. Die Zellen wurden fixiert und GFP-mikroskopisch analysiert (2.10.4).

Im Vergleich zum wildtypisch exprimierten Gbp2p-GFP führt eine Gbp2p-GFP Überexpression in *sky1Δ*-Zellen zu einer leichten Anreicherung des Proteins im Kern (Abb. 41, B). Eine Überexpression kann offensichtlich die starke zytoplasmatische Mislokalisierung von Gbp2p-GFP in *sky1Δ* partiell wieder aufheben (Abb. 41, A u. B).

Um herauszufinden, ob eine genetische Interaktion von *sky1Δ* und *prp17Δ* auf mangelnde nukleäre Proteinkonzentrationen von Gbp2p im Kern zurückzuführen sind, die möglicherweise einen Einfluß auf das nukleäre Spleißing und/oder den mRNA Transport nehmen, wurden Überexpressionsanalysen in *prp17Δ sky1Δ* durchgeführt. Die jeweils in 2μ Vektoren integrierten, durch Galaktose induzierbaren SR-ähnlichen Proteine wurden in die *sky1Δ prp17Δ* Doppelmutante über Transformation eingebracht. Während diese Vektoren einen *LEU2*-Marker aufweisen, wurde in der Konstruktion der letalen *sky1Δ prp17Δ* Doppel-Deletion ein integriertes *PRP17*, *CEN*, *URA3*-Plasmid mitgeführt. Die resultierenden Stämme wurden auf Galaktose-haltigen FOA-Platten getropft. Ein Wachstum auf Galaktose-haltigen FOA-Platten (2.8.2) selektiert Zellen, die das *PRP17*, *CEN*, *URA3*-Plasmid verloren haben und Gbp2p, Hrb1p oder Npl3p überexprimieren, so dass eine entsprechende Suppressionsanalyse in der Doppelmutante *skyΔ prp17Δ* möglich wird. Nach vier Tagen Wachstum bei 25°C wurden die Wachstumsraten bestimmt (Abb. 42).

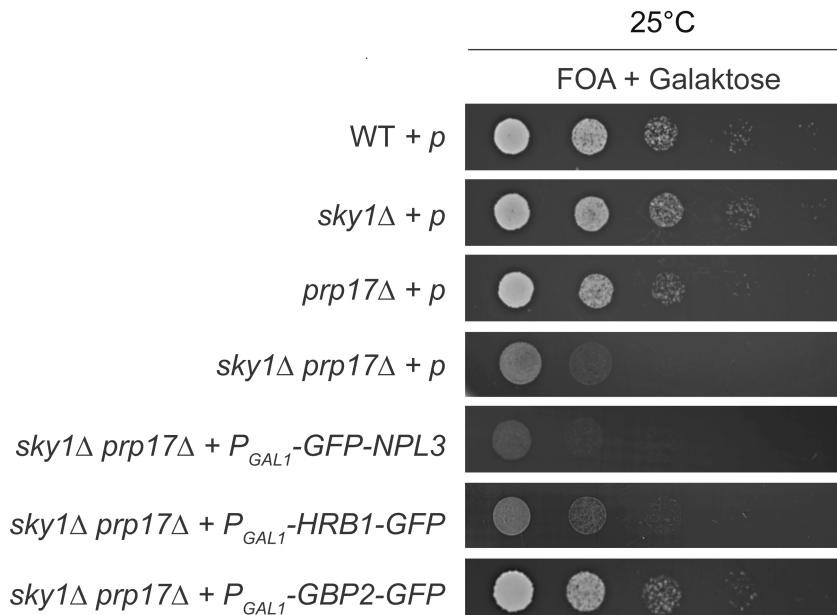


Abb. 42: Eine Gbp2p Überexpression kann die synthetische Letalität in *sky1Δ prp17Δ* aufheben. WT- und *sky1Δ*-Zellen wurden mit einem Leervektor transformiert. *prp17Δ* wurde für die Durchführung der Kreuzung mit *sky1Δ* zuvor mit einem *PRP17*, *CEN*, *URA3*-Plasmid transformiert. Die resultierende Doppelkombination *prp17Δ sky1Δ* enthält somit das wildtypische *PRP17*, *CEN*, *URA3*-Plasmid. FOA-Agarmedium selektiert auf den Verlust des *PRP17*, *CEN*, *URA3*-Plasmids. Für die Analyse eines potentiellen Wachstumsvorteils durch überexprimierte SR-ähnliche Proteine erfolgte die Transformation von P_{GAL1} -GFP-NPL3, P_{GAL1} -HRB1-GFP oder P_{GAL1} -GBP2-GFP *LEU2* 2μ -Plasmiden. Diese resultierende Stämme wurden auf Galaktose-haltigen FOA-Platten in seriellen Zellverdünnungen aufgetropft und für 4 Tage bei 25°C inkubiert.

Eine Überexpression von Gbp2p stellt den Wachstumsdefekt auf Wildtypniveau wieder her. Eine Hrb1p Überexpression zeigt hingegen nur einen minimalen und eine Npl3p Überexpression keinen Suppressionseffekt (Abb. 42).

Diese Ergebnisse liefern den Hinweis dafür, dass Sky1p insbesondere wichtig ist für den Reimport von Gbp2p zurück in den Zellkern. Die synthetischen Effekte zwischen *prp17Δ* und *sky1Δ* können über die entsprechende Gbp2p Mislokalisierung zustande kommen. Möglicherweise ist eine adäquate Konzentration von Gbp2p im Kern wichtig für den effektiven Ablauf des Spleißingprozess.

3.2.5 Deletionen von *GBP2* und *HRB1* verursachen starke Expressionsabnahmen Intron-haltiger Gene

Zunächst wurde analysiert, ob die Einzeldelationen von *npl3Δ*, *gbp2Δ*, oder *hrb1Δ* und die Doppel-Deletion *gbp2Δ hrb1Δ* Auswirkungen auf die Spleißing Aktivität haben und zur Anreicherung von ungespleißten mRNAs führen. Für diese Analyse wurde ein GFP exprimierendes Reporterkonstrukt verwendet (Abb. 43, A). Das unter der Kontrolle eines *ADH1*-Promoters konstitutiv exprimierte *GFP* wird durch eine aus dem Aktin-Gen stammende Intronsequenz im GFP-ORF unterbrochen (Abb. 43, A). Auf Nukleinsäure Ebene entsteht für das korrekt gespleißte GFP-Transkript ein 700 bp Sequenzprodukt. Das ungespleißte *GFP*-Konstrukt ergibt ein 1000 bp Produkt. Die Stämme WT, *npl3Δ*, *hrb1Δ*, *gbp2Δ*, *hrb1Δ gbp2Δ*, *prp8-908/988*, *prp17Δ* und *prp6-1* wurden mit dem Plasmid-kodierten Intron enthaltenden GFP-Konstrukt transformiert. Prp6p ist bekannt als spleißosomale Kernkomponente. Die ts-Mutante *prp6-1* bewirkt bekannterweise starke Spleißing Defekte und wurde daher im Experiment als Spleißing defekte Positivkontrolle mitgeführt (Legrain & Rosbash, 1989). Entsprechende Zellen der logarithmischen Wachstumsphase wurden nach einer Inkubation bei 37°C für 30 min geerntet und die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert. Nach elektrophoretischer Auftrennung der RNA-Moleküle im 1,5% Formaldehyd-Agarosegel und nachfolgendem Vakuum-Blot Transfer auf Nylonmembranen erfolgte die Detektion gespleißter und ungespleißter GFP-Produkte mittels Hybridisierung mit einer [³²P] markierten GFP-Sonde (2.11.1). Der Anteil an ungespleißtem *GFP* im Verhältnis zum *GFP*-Gesamt-Radioaktivsignal wurde mit Hilfe des PhosphorImager-Systems und dem Programm Image Gauge 5.1 analysiert und prozentual berechnet. In Wildtyp konnte eine vollständig gepleißte *GFP*-Bande visualisiert werden (Abb. 43, A u. B). Für *npl3Δ* wurden anteilige *GFP*-Intron Anreicherungen von 15% im Vergleich zum Wildtyp detektiert. Eine *hrb1Δ* Deletion zeigt eine geringe Akkumulation des ungespleißten Reporterkonstrukts von nur 7,5%. Eine 17,5%-ige Anreicherung des ungespleißten *GFP* wurde in *gbp2Δ* gemessen. Die Doppel-Deletion *gbp2Δ hrb1Δ* führt nur zu einer unwesentlichen Erhöhung auf 18%. *GBP2* ist damit der für

diese Spleißing Defekte hauptverantwortliche Faktor in der Doppel-Deletion *gbp2Δ hrb1Δ*. Deutlich höher werden die Prozentwerte für eine *GFP*-Intron-Anreicherung in den Spleißingfaktor-Mutanten.

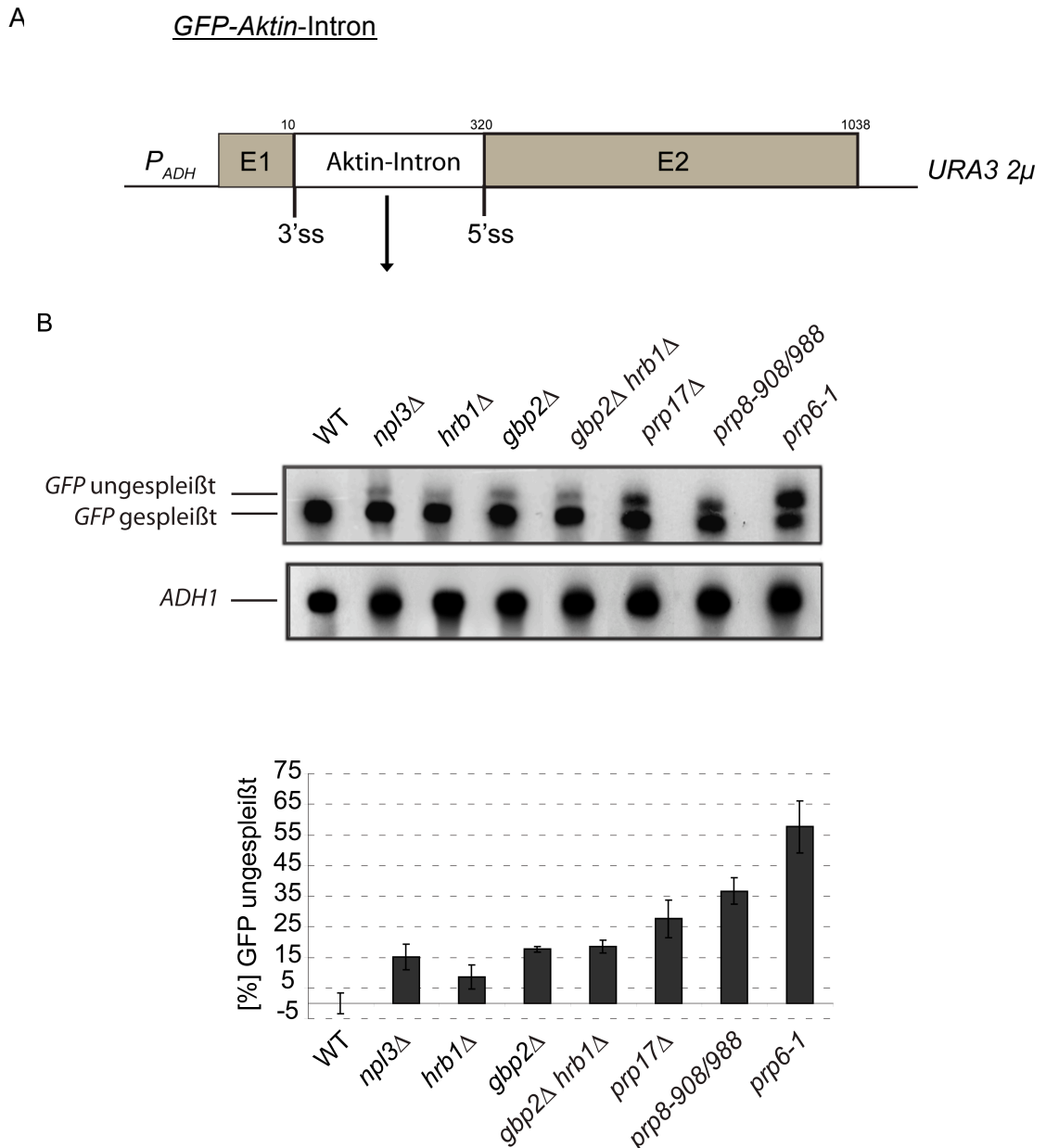
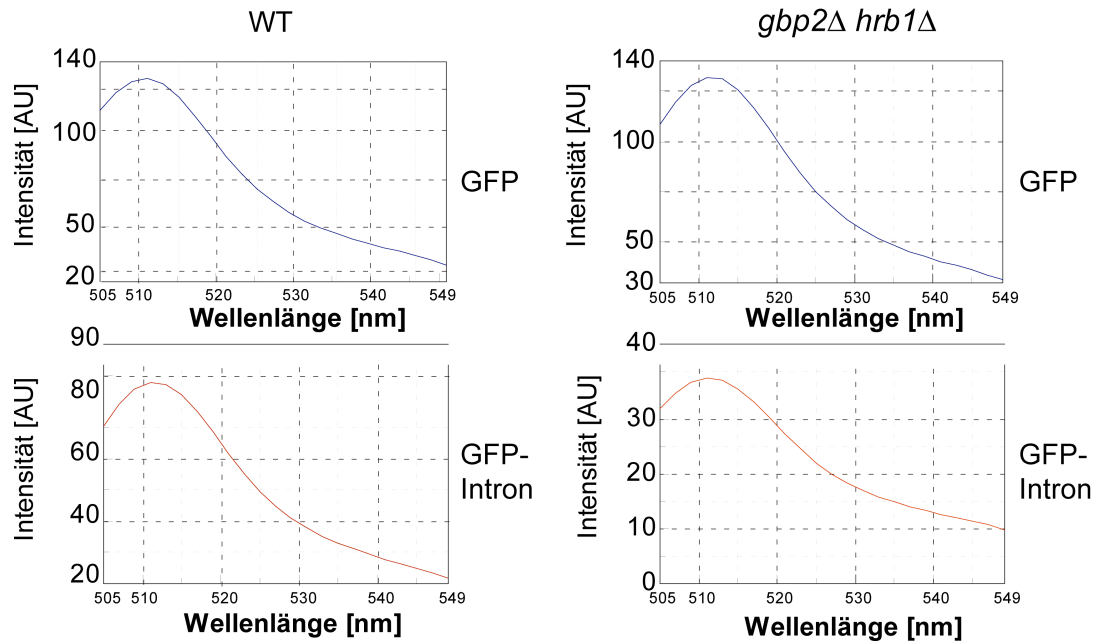


Abb. 43: Northern Blot Studie zur Analyse ungespleißter Transkriptanreicherungen in SR-Protein Deletionsstämmen und Spleißing-Faktor Mutanten. A) In Northern Blot Experimenten wurden die Transkripte des *GFP*-Aktin-Intron Reporterkonstruktes analysiert. B) Zellen der angegebenen Stämme wurden bis zu einer Zellzahl von 2×10^7 Zellen/ml bei 25°C angezogen und anschließend bei 37°C für 30 min inkubiert. Gesamt-RNA wurde aus entsprechenden Zellextrakten isoliert. 70 µg Gesamt-RNA wurden im 1,5% Formaldehyd-Agarosegel der Größe nach elektrophoretisch separiert und auf eine Hybond N⁺-Nylonmembran mittels Vakuum-Transfer übertragen. Die Membran wurde nach der Prähybridisierung mit einer [³²P]-markierten *GFP*-Sonde über Nacht hybridisiert. Als Ladekontrolle der Genexpression wurde das „house-keeping“ Gen *ADH1* mit entsprechender *ADH1*-Sonde ebenfalls analysiert. Die Signalstärken wurden mittels Phosphorimager detektiert und mit Hilfe des Programms ImageGauge 5.1 ausgewertet. Drei unabhängige Experimente wurden statistisch ausgewertet.

In *prp17Δ* wird eine Akkumulation des ungespleißten Reporter-konstruktes von 28% erhalten. In der *prp8-908/988*-Mutante beträgt die Anreicherung 37%. Mit einer anteiligen *GFP*-Intron Anreicherung von 59% wird in der *prp6-1* Spleißing Mutante der höchste Anteil an ungespleißten *GFP*-Transkripten erhalten (Abb. 43, B).

Der Einfluß von SR-Protein Deletionen auf die Proteinexpressionsrate von gespleißten Transkripten wurde im nächsten Experiment untersucht. Hierfür wurde unter Verwendung des *GFP*-Intron Reporterkonstruktes (Abb. 43, A) analysiert, inwieweit gespleißte Konstrukte in das Zytoplasma transportiert und zu Protein translatiert werden. Die Konzentration von translatiertem *GFP* ist proportional zur *GFP*-Fluoreszenzintensität, die das Fluorophor emittiert. Die *GFP* Fluoreszenzintensitäten wurden daher in einem Fluoreszenz-Spektrometer bei einer Exzitationswellenlänge von 480 nm und der Emissionshöchstwert bei einer Wellenlänge von 512 nm aufgenommen (2.10.5). Als Kontrolle wurde ein entsprechendes *GFP* Konstrukt ohne Intron-Insertion im Experiment mitgeführt, um eventuelle Translationsdefekte im jeweiligen Stammhintergrund ausschließen zu können. Darüberhinaus wurde eine Eigenfluoreszenz, die vom Plasmid ohne *GFP* Sequenz ausgehen könnten, zuvor überprüft und mit erzielten Werten von ~ 4 AU als vernachlässigbar eingestuft. In Wildtyp wird für das Intron-lose *GFP* eine Fluoreszenzintensität von 134 AU erzielt, während für das zu spleißende Intron-*GFP*-Konstrukt Fluoreszenzwerte von 84 AU erzielt werden (Abb. 44, A). Somit wird in Wildtyp eine reduzierte Expressionsrate für gespleißtes *GFP* festgestellt. Das wildtypische Verhältnis aus Intron-haltigen zu Intron-losen *GFP*-Fluoreszenz-Intensitäten liefert den 100% Wert (Abb. 41, B). Im Vergleich dazu führte innerhalb der SR-Protein Gruppe eine *NPL3* Deletion zu den geringsten Proteinexpressionsabnahmen des gespleißten *GFP* mit 28%. Die Abnahmen werden deutlich stärker in *hrb1Δ* mit 41% und in *gbp2Δ* mit 48%. Die Doppel-„knock out“-Kombination von *hrb1Δ gbp2Δ* führt zu einer weiteren Expressionsabnahme um 56%. Eine vergleichbare Expressionsabnahme wurde auch in der Spleißingfaktor-Nullmutante *prp17Δ* (57%) gemessen. *prp8-908/988* und *prp6-1* folgen mit den stärksten Expressionsabnahmen des Intron-haltigen Reporterproteins mit Werten von 62% und 73% (Abb. 41, B). Der in Abb. 29 bis 30 dargestellte Zusammenhang einer Sky1p abhängigen nukleären Gbp2p Lokalisation könnte bedeuten, dass Gbp2p im *sky1Δ*-Stammhintergrund in unzureichendem Maße an den im Zellkern stattfindenden Prozessen Spleißing und mRNA Transport agieren kann und damit die Proteinexpression des Intron-haltigen Reporter negativ beeinflusst. Daher wurde für *sky1Δ* ebenfalls eine Analyse der gespleißten *GFP*-Expression durchgeführt. Wie erwartet wurde eine ähnlich starke Abnahme der Expression um 44% wie auch in *gbp2Δ* (47%) festgestellt. Konsequenterweise wird in der Analyse der Doppel-Deletion aus *sky1Δ gbp2Δ* keine weitere Verstärkung der Abnahme gespleißter *GFP* Expression gefunden (51%) (Abb. 41, B), welches die oben genannte Theorie unterstützt.

A



B

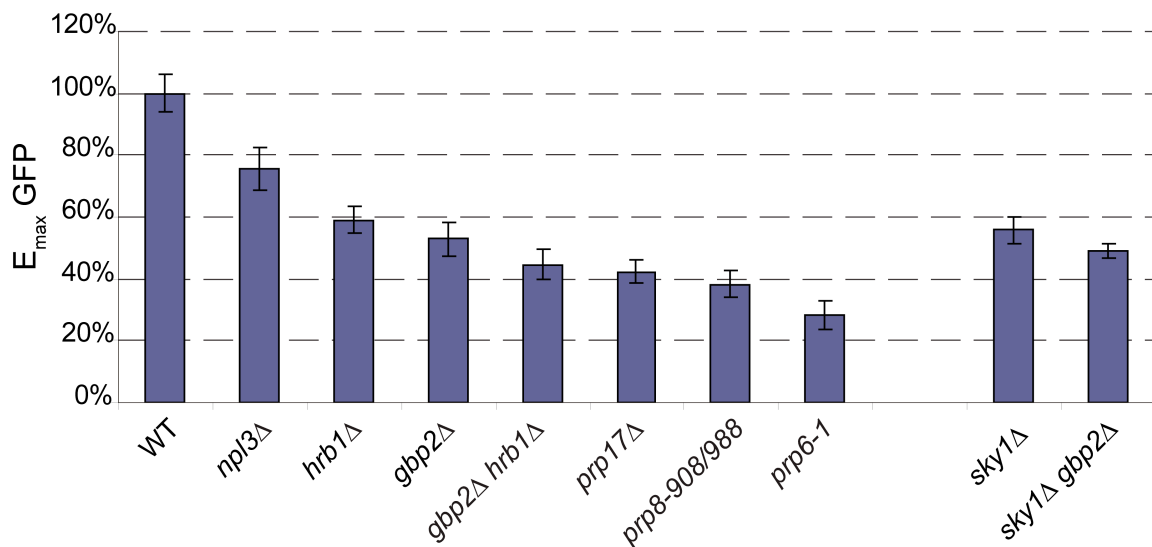


Abb. 44 A u. B: GFP-Fluoreszenz-Intensitätsmessungen von GFP- und GFP-Aktin-Intron Reporterkonstrukten. A) Emissionsspektren von GFP und GFP mit inseriertem Aktin-Intron sind im Beispiel von WT und *gbp2Δ hrb1Δ* dargestellt. B) WT, *npl3Δ*, *hrb1Δ*, *gbp2Δ*, *hrb1Δ gbp2Δ*, *prp17Δ*, *prp8-908/988* und *prp6-1* sowie *sky1Δ* und *sky1Δ gbp2Δ* wurden zum einen mit wildtypischen GFP und zum anderen mit dem Aktin Intron inseriertem GFP als Plasmid kodierte Versionen transformiert. Die Zellen wurden bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase angezogen und für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach der Zellernte wurden die Zellen in 3 ml ddH₂O aufgenommen und die GFP Fluoreszenzen im Fluoreszenz Spektrometer (2.1) bei einer Exzitationswellenlänge von 480 nm aufgenommen. Der emittierte Höchstwert wurde mit dem Programm Spectra Manager™ bei einer Emissionswellenlänge von 512 nm berechnet. B) Eine statistische Auswertung der Fluoreszenz-Höchstwerte erfolgte aus jeweils acht unabhängigen Experimenten.

Ein weiteres Experiment zur Analyse von möglichen Fehlregulationen des Spleißingprozesses, die Effekte auf Translationsebene bewirken, wurde auch mit Hilfe eines *LACZ*-Intron Hybrid-Konstruktes durchgeführt (Abb. 45, A). Auch in diesen Experimenten wurde als Kontrolle das wildtypische Intron-lose *LACZ* Gen unter Kontrolle des Galaktose induzierbaren Promoters mitanalysiert. Ein zweites *LACZ* Hybridkonstrukt enthält hingegen eine synthetische Intron-Sequenz (Abb. 45, A u. B). Nur im Falle eines korrekt gespleißten *LACZ* Gens entsteht die katalytisch aktive β -Galaktosidase, die das synthetische Substrat O-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid (ONPG) zu Galaktose und Nitrophenol umsetzt (Abb. 46) (2.10.6).

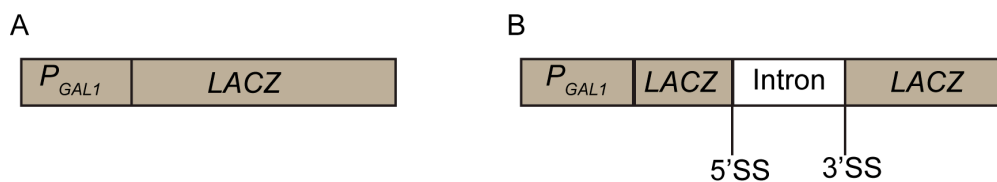


Abb. 45 A u. B: Schematische Darstellung des A) *LACZ*- und B) *LACZ*-Intron-Hybrid-Konstruktes.

Enzymatische Reaktion:



Abb. 46: β -Galaktosidase katalysierte enzymatische Reaktion unter Verwendung des künstlichen Substrates O-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid (ONPG). Die von dem *LACZ* Gen kodierte Expression der β -Galaktosidase setzt das künstliche Substrat ONPG zu Galaktose und Nitrophenol um. Nitrophenol erscheint als lösliches gelbes Produkt. Die Farbintensität kann photometrisch bei einer OD_{420} gemessen werden.

Nitrophenol zeichnet sich durch seine gelbliche Färbung aus, deren Intensität bei einer optischen Dichte von 420 nm gemessen werden kann. Je mehr β -Galaktosidase entsteht, desto höher sind die Konzentrationen an gebildetem gelblichen Nitrophenol, welche anhand von höheren Absorptionswerten gemessen werden kann. Auch hier wurden Verhältniswerte aus β -Galaktosidase-Aktivitätswerten (Units), die von Intron-losen und Intron-haltigen *LACZ*-Konstrukten erhalten wurden, gebildet. Das wildtypische Verhältnis ergibt den entsprechenden 100%-Wert (Abb. 48). Aufgrund einer Sensitivität der *NPL3* Deletion gegenüber Galaktose konnte der Stamm in dieser Analyse nicht berücksichtigt werden. Ein entsprechender Wachstumstest von *np13Δ* im Vergleich zum isogenen Wildtyp auf Galaktose-haltigen Medien kennzeichnet die Stärke der Galaktose Sensitivität. *np13Δ* zeigt bei 25°C und 37°C kein Wachstum auf Galaktose-haltigen Festmedium (Abb. 47).

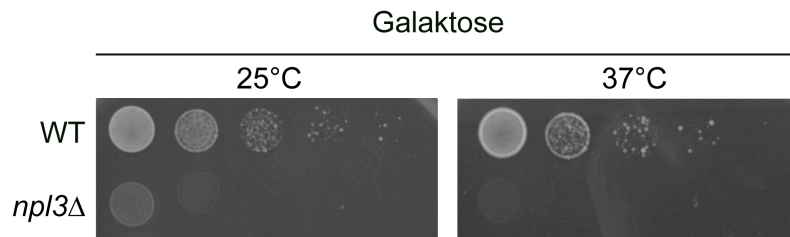


Abb. 47: Galaktose abhängige Letalität des *npl3Δ*. Wachstumsanalyse serieller Zellverdünnungen von WT und *npl3Δ*-Zellen auf Galaktose anstelle von Glukose enthaltendem YPD Festmedium. Die Zellen wurden für 3 Tage bei 25°C und 37°C inkubiert.

In den β -Galaktosidase Aktivitätsmessungen (Abb. 48) zeigt sich in *hrb1Δ* eine Abnahme der gespleißten β -Galaktosidase Aktivität um 27% im Vergleich zum Wildtyp. Eine *gbp2Δ* Deletion führt zu einer weit signifikanteren Abnahme von 48%. In der Doppel-Deletion steigt diese Abnahme auf 66% an. In *prp17Δ* werden ähnliche Werte mit einer Abnahme um 72% erhalten. Es bestätigen sich in diesem Experiment die Tendenzen, die auch in den vorherig dargestellten Analysen zur Messung gespleißter GFP-Fluoreszenzintensitäten gemessen wurden. Darüberhinaus wird in dieser Analyse deutlich, dass eine *gbp2Δ* Deletion gegenüber einer *hrb1Δ* Deletion stärkere Auswirkungen auf den Expressionsspiegel des Intron-haltigen Reportergens hat. Auch in diesem Experiment sind die Defekte von *gbp2Δ hrb1Δ* und *prp17Δ* in etwa miteinander vergleichbar (Abb. 48). Nach diesen beiden Experimenten, die die Protein Expression von Intron-haltigen Genen analysiert, können starke Defekte in der Doppel-Deletion *gbp2Δ hrb1Δ* festgestellt werden, die vergleichbar sind mit den Effekten der Spleißingfaktor-Mutante *prp17Δ*.

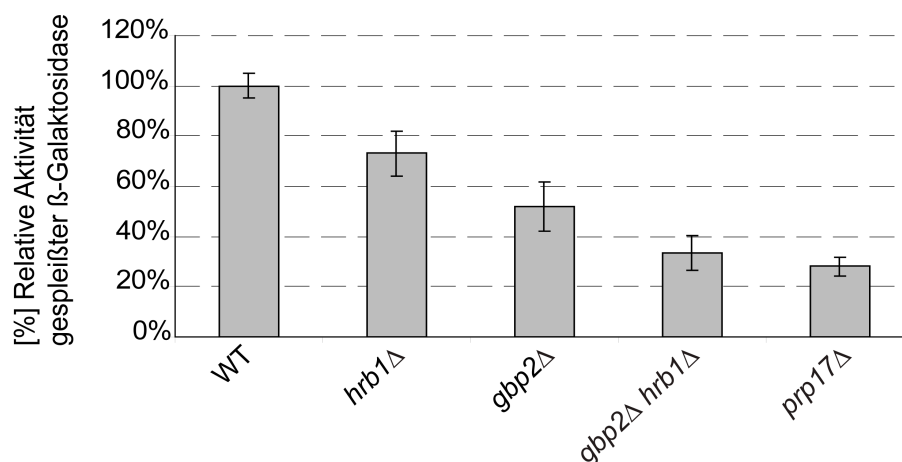


Abb. 48 Relative Aktivitätsmessungen gespleißter β -Galaktosidase. WT, *hrb1Δ*, *gbp2Δ*, *hrb1Δ gbp2Δ* und *prp17Δ* wurden mit P_{GAL1} -LACZ und P_{GAL1} -LACZ-Intron-Reportergen-Plasmiden transformiert. Die Zellen wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase inkubiert und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Zelllysate wurden mit ONPG versetzt und die enzymatische Umsetzung durch wildtypische und gespleißte β -Galaktosidase mittels OD₄₂₀-Messungen bestimmt. Die Berechnung der β -Galaktosidase Aktivität ermittelt sich aus der Formel: Aktivität (Units) = 1000 x OD₄₂₀ / Inkubationszeit x Vol. x OD₆₀₀ Zellen. Die Unit-Werte von gespleißter zu wildtypischer β -Galaktosidase Aktivität wurde ins Verhältnis zueinander gesetzt mit WT = 100% (2.10.6).

Die auf Translationsebene stark reduzierten Expressionsabnahmen Intron-haltiger Reportergene (*GFP-Aktin*-Intron und *LACZ*-Intron) insbesondere in *gbp2Δ hrb1Δ* sind deutlich stärker als die im Northern Blot identifizierten Spleißing-Defekte auf Transkriptionsebene. Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, dass *GBP2* und *HRB1* weniger eine direkte Funktion im Spleißing haben, sondern vielmehr eine Funktion auf dem Weg zwischen prä-mRNA-Spleißing und Translation spielen. Ein essentieller zellulärer Prozess als Bindeglied zwischen nukleärem Spleißing und Translation im Zytoplasma ist der mRNA Export.

3.2.6 Additive synthetische mRNA Export-Defekte von Spleißingfaktor

Mutanten in Kombination mit *gbp2Δ*, *hrb1Δ* und *npl3Δ*

In mRNA Export Analysen wurden potentielle Export-Defekte von Poly(A)⁺-RNAs analysiert. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe einer Cy3 markierten Oligo dT₍₅₀₎-Sonde, die nach Zymolase Behandlung und Permeabilisierung der Zellwand in die Zelle eingebracht wurde. Die Cy3-Oligo dT₍₅₀₎ Sonde hybridisiert mit dem Poly(A)-Schwanz der RNA Moleküle (2.11.1). Die mRNA Export Analysen (Abb. 45) zeigen, dass in Wildtyp-Zellen in beiden Kompartimenten mRNA-Moleküle visualisiert werden können. Im Sinne einer Positivkontrolle für einen mRNA Export-Defekt wird in der Nukleoporenmutante *rat7-1* eine Akkumulation von Poly(A)⁺ RNA im Zellkern nachgewiesen. Weder in *npl3Δ* und *hrb1Δ* noch in *gbp2Δ* kann ein mRNA Export Defekt nach 3h Inkubation bei 37°C nachgewiesen werden (Abb. 49). Dies gilt ebenso für die Doppel-Deletion aus *gbp2Δ hrb1Δ*. Interessanterweise wurde jedoch bereits gezeigt, dass eine Überexpression von Gbp2p zu mRNA Export-Defekten führt, die sich auch in Wachstumsdefekten der Zellen bemerkbar machen (Häcker & Krebber, 2003; Hurt *et al.*, 2004). Werden die Spleißingfaktor-Mutanten *prp17Δ* und *prp8-908/988* im mRNA Export Assay analysiert, so zeigen diese nach Inkubation bei 37°C für 30 min und 1h ebenfalls keine identifizierbaren Akkumulationen der Cy3 markierten Poly(A)⁺ RNA im Zellkern (Daten nicht gezeigt). Erst nach einer Temperaturverschiebung nach 37°C für 3h können leichte mRNA Export-Defekte verzeichnet werden (Abb. 49). Interessanterweise führen die genetischen Doppelkombinationen *gbp2Δ prp17Δ* oder *gbp2Δ prp8-908/988* zu einer Verstärkung des mRNA Export-Defektes (Abb. 49).

Eine vermehrte mRNA Akkumulation im Zellkern kann auch in *hrb1Δ prp17Δ* und *hrb1Δ prp8-908/988* beobachtet werden. Eine *npl3Δ prp17Δ* und *npl3Δ prp8-908/988* Doppel-Deletion führt zu intranukleären punktartigen Poly(A)⁺ RNA Akkumulationen, die auf eine Blockierung des Transkriptionsablaufes hindeuten (Libri *et al.*, 2002; Abb. 49). Die beobachteten Export-Defekte in *gbp2Δ prp17Δ* oder *gbp2Δ prp8-908/988* und *hrb1Δ prp17Δ* oder *hrb1Δ prp8-*

908/988 sind hingegen über den gesamten Zellkern verteilt, so wie sie für die klassischen mRNA Exportfaktor-Mutanten und Nukleoporin-Mutanten des Kernporen-Komplexes bekannt sind.

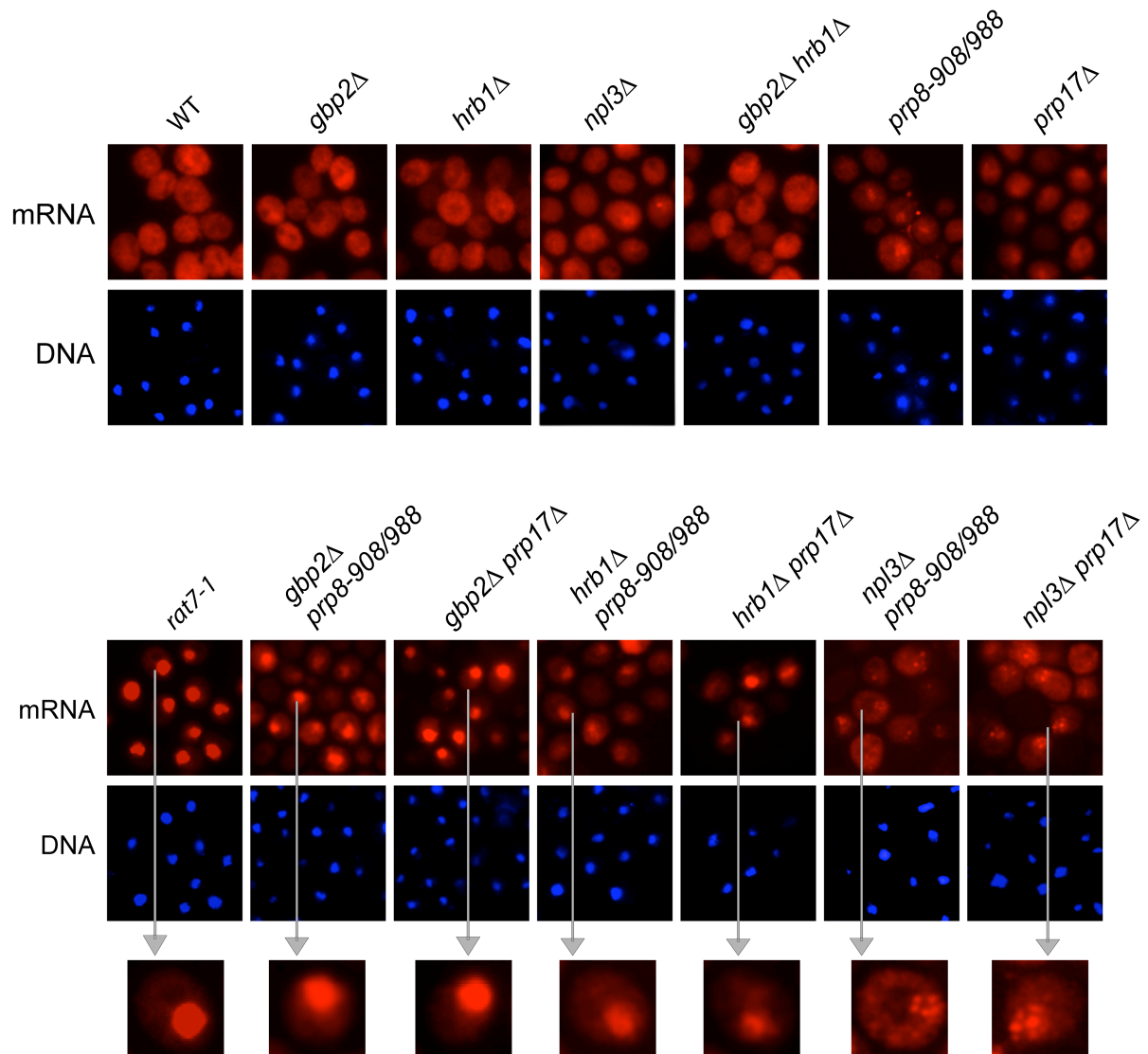


Abb. 49: Signifikante synthetische mRNA Export Defekte in *gbp2*Δ *prp8-908/988*, *gbp2*Δ *prp17*Δ, *hrb1*Δ *prp8-908/988*, *hrb1*Δ *prp17*Δ, *npl3*Δ *prp8-908/988* und *npl3*Δ *prp17*Δ. Die aufgeführten Stämme wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen und einem anschließendem Temperaturwechsel nach 37°C für 3h unterzogen. Die Zellen wurden fixiert und nach Permeabilisierung und Zymolase-Behandlung mit einer Cy3-markierten Oligo dT₍₅₀₎-Sonde über Nacht hybridisiert. Nach mehreren Waschschritten und DAPI-Färbung erfolgte die Fluoreszenz-mikroskopische mRNA Lokalisationsstudie.

Diese unterschiedlichen Phänotypen eines mRNA Export Defektes könnten auf eine Differenzierung in der zeitlichen Abfolge der nukleär fehlregulierten Prozesse hindeuten. Möglicherweise haben Gbp2p und Hrb1p eine unterstützende Funktion im mRNA Export von gespleißten mRNAs und binden diese präferentiell über ihre Interaktion mit den Spleißingfaktoren der Spleißing-Spätphase. Falls Gbp2p und Hrb1p eine Funktion im Export

von präferentiell gespleißten mRNAs haben sollten, so könnte eine Rekrutierung dieser SR-ähnlichen Proteine Gbp2p und Hrb1p zur mRNA Spleißing-abhängig erfolgen.

3.2.7 Spleißing-abhängige Rekrutierung von Gbp2p und Hrb1p zur mRNA

Um zu überprüfen, ob Gbp2p und Hrb1p im Gegensatz zu Npl3p Spleißing-abhängig zur mRNA rekrutiert werden, wurden in den nachfolgenden Experimenten die Bindungen zwischen mRNA und Gbp2p, Hrb1p oder Npl3p in Wildtyp und in den Spleißingfaktor-Mutanten in RNA-Ko-Immunopräzipitationen (RNA-Ko-IPs) analysiert (2.11.3). In diesen Experimenten wurden wie auch in den Protein-Ko-Immunopräzipitationen die myc getaggten Gbp2p, Hrb1p und Npl3p-Proteine unter Verwendung des spezifischen myc-Antikörpers als Antikörper-Protein-Komplex an G-Sepharose „Beads“ gekoppelt. Diese Experimente wurden in vergleichenden Studien sowohl in Wildtyp als auch in den Spleißingfaktor-Mutanten *prp8-908/988*, *prp17Δ* und *prp43-S247A* durchgeführt (Abb. 50, 51 u. 52). Die in der RNA-Ko-IP gebundenen RNA-Moleküle wurden nach extensiven Waschschritten isoliert (2.11.3). Gleiche Volumenmengen an so gewonnener RNA wurden anschließend im mRNA-„Dot Blot“ (2.11.2) analysiert. Zur Bestimmung des mRNA Gehalts erfolgte die Hybridisierung mit einer [³²P] markierten Oligo-d(T₅₂)-Sonde. Die Signalstärken der [³²P]-markierten Poly(A)⁺ RNA wurden mit Hilfe des Phosphorimagers und unter Verwendung des Programms Image Gauge 5.1 ausgewertet. Die statistische Auswertung der „Dot Blot“ Experimente zeigt eine deutliche Schwächung der Gbp2p-mRNA Assoziation in *prp8-908/988* im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 50). Die Reduktion der mRNA Bindung beträgt 77% (Abb. 50, A u. B). Die Assoziation von Hrb1p-myc Proteinen und der mRNA wird in der Spleißingfaktor-Mutante *prp8-908/988* im Vergleich zum Wildtyp um einen prozentualen Anteil von 37% verringert (Abb. 50, A u. B). Die Bindungen zwischen myc-Npl3p und mRNA sind hingegen nahezu unverändert (Reduktion um 2%) (Abb. 50, A u. B). Um diesen Befund auch in einer weiteren Spleißingfaktor-Mutante zu analysieren, wurden die Experimente auch in der Nullmutante *prp17Δ* durchgeführt (Abb. 51). Tatsächlich weist Gbp2p-myc eine vergleichbare Verringerung der mRNA Assoziation in *prp17Δ* auf. Die Interaktion zwischen Gbp2p-myc Proteinen und mRNA ist mit einer verringerten Assoziation um 92% sehr stark reduziert. Signifikante Abnahmen der mRNA Bindung durch Hrb1p-myc Proteine wird auch in der *prp17Δ* Nullmutante gefunden. Hier beträgt die verringerte Assoziation 77%. Die Bindungen zwischen mRNA und myc-Npl3p-Proteine sind hingegen in *prp17Δ* nur um geringe 19% verringert (Abb. 51).

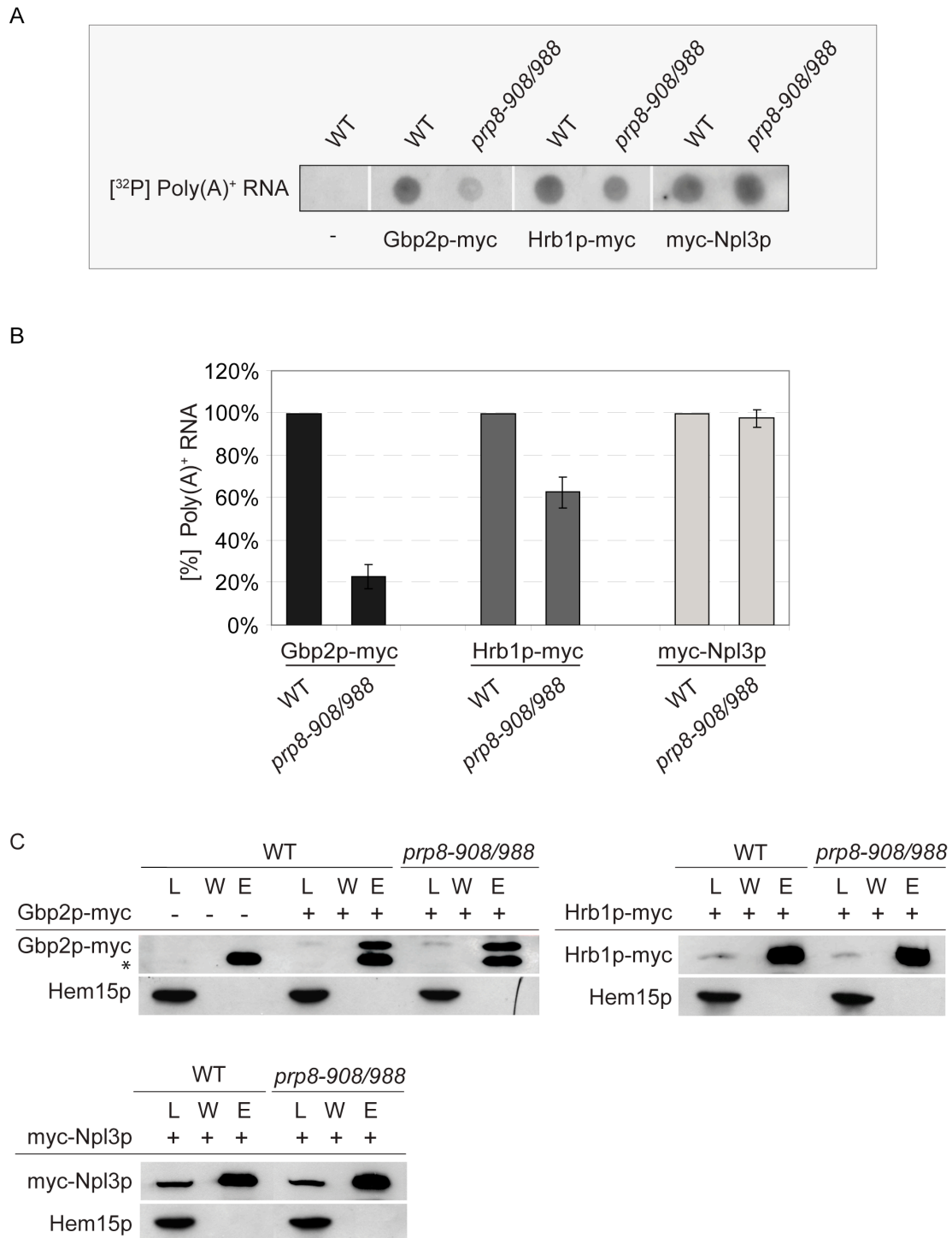
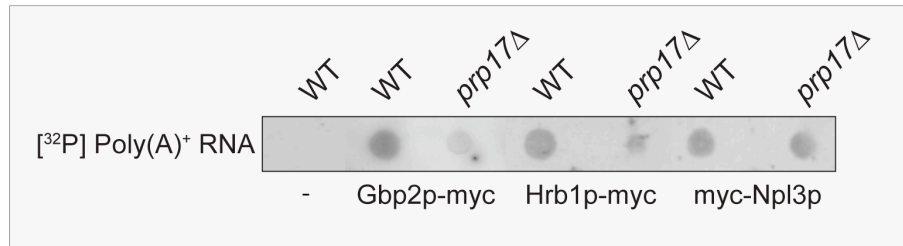
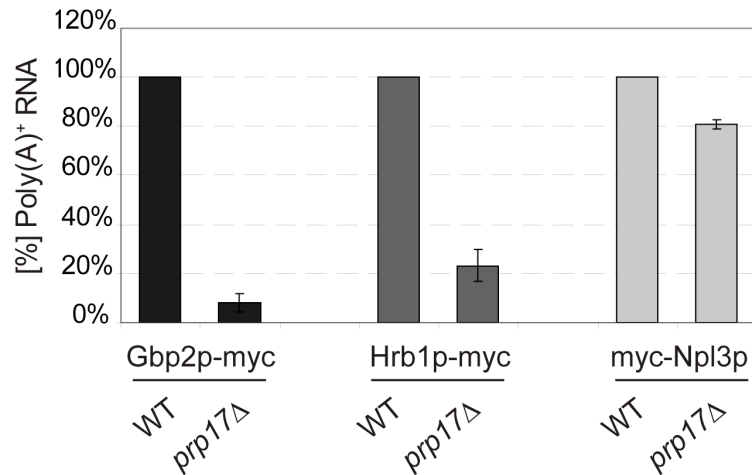


Abb. 50: Die mRNA Assoziation der mRNA Bindeproteine Gbp2p und Hrb1p ist in *prp8-908/988* stark verringert In RNA-Ko-Immunopräzipitationen (RNA-Ko-IP) erfolgte die Isolierung von an Gbp2p-myc, Hrb1p-myc oder myc-Npl3p gebundener RNA. Das Experiment wurden in vergleichenden Analysen in Wildtyp und in *prp8-908/988* durchgeführt. Die Zellen wurden bis zu dem Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase bei 25°C kultiviert und anschließend für 30 min bei 37°C inkubiert (2.11.3). (A u. B) Gleiche Volumenmengen eluierter RNA wurden im „Dot Blot“ Experiment eingesetzt und in ihrem Poly(A)⁺/mRNA-Gehalt analysiert. Die Detektion des Poly(A)⁺ RNA Gehalts erfolgte mittels Hybridisierung mit einer [³²P] markierten Oligo-d(T₅₂)-Sonde. Die quantitative Auswertung der [³²P]-Markierung erfolgte im PhosphorImager (2.3) und mit Hilfe des Programm Image Gauge 5.1 in drei unabhängigen Experimenten. C) Western Blot Kontrolle der in der RNA-Ko-IP präzipitierten myc-Proteine mit einem α-myc-Antikörper. Als Ladekontrolle und zur Überprüfung unspezifischer Bindungen, wurde das Hem15p Protein mit einem α-Hem15-Antikörper nachgewiesen. *: Immunglobulin-Bande (schwere Kette). Diese Bande erscheint je nach Laufstrecke unterhalb der detektierten Gbp2p-myc Bande.

A



B



C

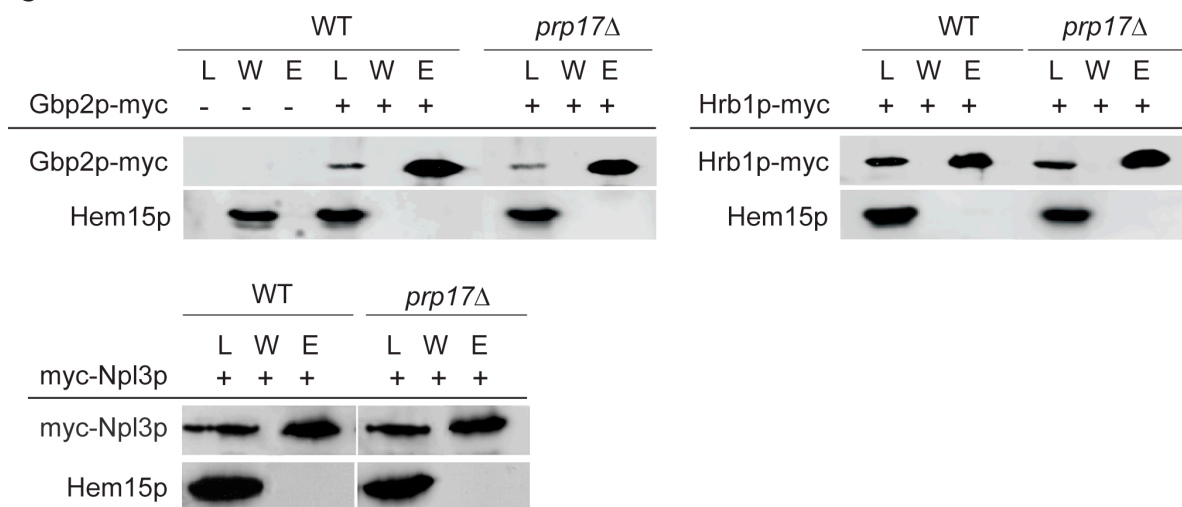


Abb. 51: Die mRNA Assoziation der mRNA Bindeproteine Gbp2p und Hrb1p ist im Gegensatz zu Npl3p in *prp17* Δ stark verringert. In RNA-Ko-IP Studien erfolgte die Isolierung von an Gbp2p-myc, Hrb1p-myc oder myc-Npl3p gebundener RNA. Das Experiment wurden in vergleichenden Analysen in Wildtyp und in *prp17* Δ durchgeführt. Die Zellen wurden bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase bei 25°C kultiviert und anschließend für 30 min bei 37°C inkubiert A) Gleiche Volumenmengen eluierter RNA wurden im „Dot Blot“ Experiment analysiert. Die Detektion des Poly(A)⁺ RNA Gehalts erfolgte mittels Hybridisierung mit einer $[^{32}\text{P}]$ markierten Oligo-d(T₅₂)-Sonde. Die Stärke der $[^{32}\text{P}]$ Markierung wurde im Phosphorimager analysiert und mit dem Programm Image Gauge 5.1 quantitativ in drei unabhängigen Experimenten ausgewertet (B). C) Western Blot Kontrolle der im RNA-Ko-IP Experiment präzipitierten myc-Proteine über Detektion mit einem α -myc-Antikörper. Hem15p wurde mit einem α -Hem15 Antikörper nachgewiesen.

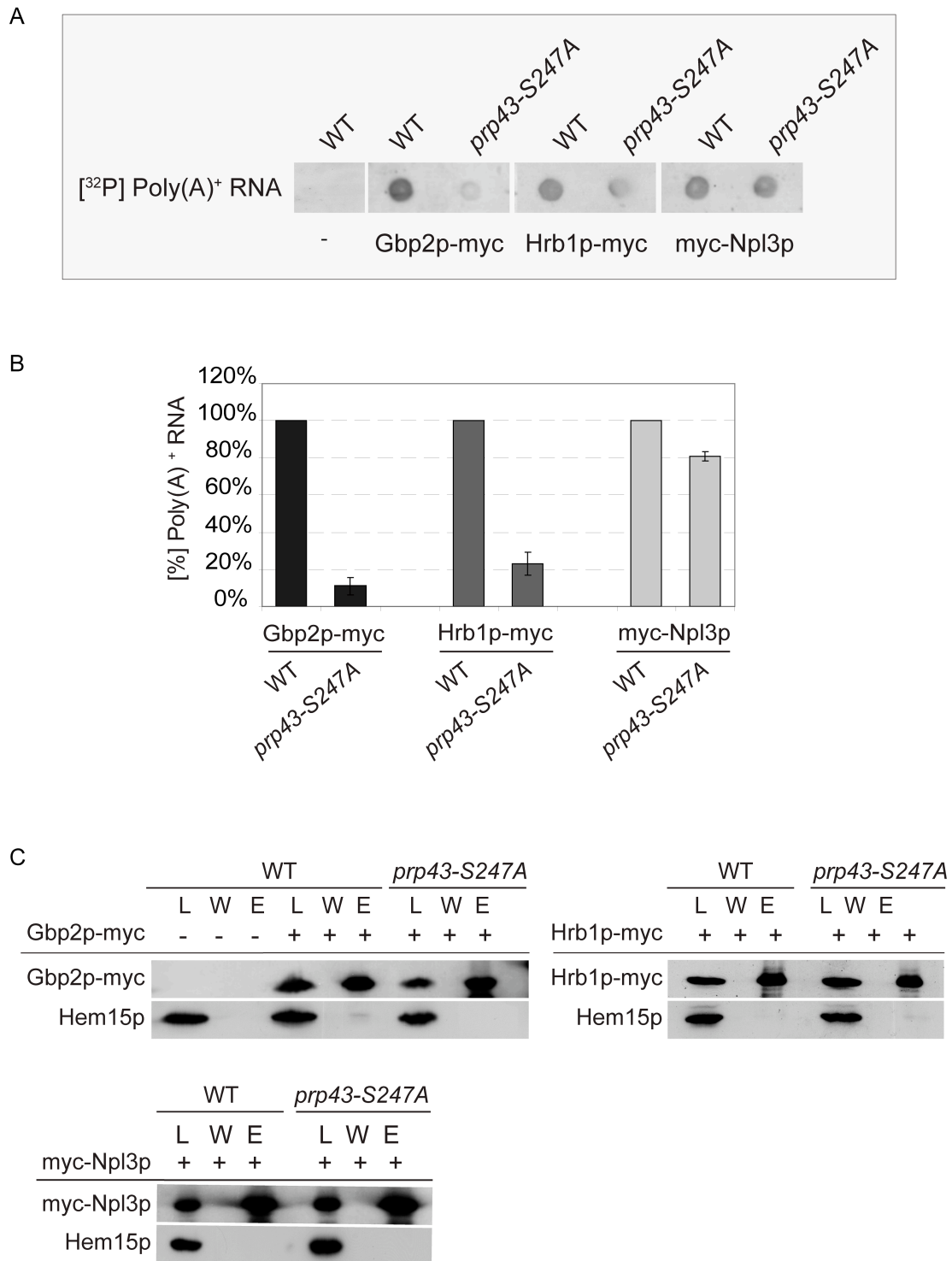


Abb. 52: Die Bindung zwischen mRNA und Gbp2p oder Hrb1p ist in *prp43-S247A* stark reduziert. In RNA-Ko-IP Studien erfolgte die Isolierung von an Gbp2p-myc, Hrb1p-myc oder myc-Npl3p gebundener RNA. Das Experiment wurde in vergleichenden Analysen in Wildtyp und in *prp43-S247A* durchgeführt. Die Zellen wurden bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase bei 25°C kultiviert und anschließend für 30 min bei 37°C inkubiert. A) Gleiche Mengen eluierter RNA wurden im RNA-„Dot Blot“ Experiment analysiert. Die Detektion des Poly(A)⁺ RNA Gehalts erfolgte über eine Hybridisierung mit einer [³²P] markierten Oligo-d(T₅₂)-Sonde. Die Stärke der [³²P] Markierung wurde im Phosphorimager analysiert und statistisch in drei unabhängigen Experimenten ausgewertet (A u. B). C) In Western Blot Analysen erfolgte die Detektion der im RNA-Ko-IP Experiment präzipitierten myc-Proteine. Gbp2p-myc, Hrb1p-myc und myc-Npl3p wurden in Lysat und Eluatproben mittels α-myc-Antikörper nachgewiesen. Hem15p wurde mit einem α-Hem15 Antikörper detektiert.

Dieses Experiment wurde schließlich auch in der dritten Spleißingfaktor-Mutante *prp43-S247A* durchgeführt und die stark verringerten mRNA Bindungen von Gbp2p und Hrb1p bestätigt (Abb. 52). In *prp43-S247A* liegt eine 89%-ige Reduktion der mRNA Bindung von Gbp2p-myc vor. Wie auch in *prp17Δ* ist die Hrb1p-myc mRNA Assoziation in *prp43-S247A* um 77% reduziert. Im Gegensatz dazu ist die myc-Npl3p-mRNA Bindung auch in dieser Spleißingfaktor Mutante wesentlich weniger beeinträchtigt. Die mRNA Bindungen von myc-Npl3p sind nur um 19% verringert (Abb. 52).

Diese Experimente zeigen deutlich, dass die mRNA Assoziation der mRNA Bindeproteine Hrb1p und insbesondere Gbp2p in den analysierten Spleißingfaktor-Mutanten unterbunden bzw. stark beeinträchtigt wird. Es wird daher eine signifikante Abhängigkeit der mRNA Bindung durch Gbp2p und Hrb1p vom Spleißingprozess erkennbar. Npl3p, das Protein, das während der Transkriptionsinitiation über die RNA-Polymerase II bereits frühzeitig auf die mRNA geladen wird, wird in seiner mRNA Assoziation durch Spleißingfaktor Mutationen nicht stark beeinträchtigt.

Neben den SR-ähnlichen mRNA Bindeproteinen erfolgte auch die Analyse der THO-Komplex Komponenten Mft1p und Tho2p in RNA-Ko-IP Studien. Der THO-Komplex bindet naszierende RNA und wandert während der Transkriptionselongation entlang des aktivierten Gens. Dieser Komplex unterstützt des weiteren den Transkriptionsablauf, indem es die Ausbildung von DNA-RNA Hybridstrukturen verhindert. Darüberhinaus bildet der THO-Komplex den Grundbaustein für die spätere Bildung des TREX-1-Komplex. Bislang wurde vorgeschlagen, dass Gbp2p und Hrb1p über den THO-Komplex zur mRNA Bindung gelangen. In der Hefe ist die zeitliche Reihenfolge der Spleißosom und THO-Komplex Rekrutierung zur mRNA jedoch noch völlig unklar. Daher wurde mittels RNA-Ko-IP ermittelt, ob eine RNA Bindung von THO-Komplex Komponenten, ähnlich wie für Gbp2p und Hrb1p beobachtet, Spleißing-abhängig erfolgt. Die RNA-Ko-IP wurden mit Hilfe von Plasmid kodiertem GFP-getagtem Tho2p oder endogen TAP getagtem Mft1p unter Wildtyp-Bedingungen und in den Spleißingfaktor-Mutanten *prp8-908/988*, *prp17Δ* und *prp43-S247A* durchgeführt (Abb. 53 und Abb. 54). In den RNA Ko-IP Studien wurde im Vergleich zum Wildtyp eine reduzierte Poly(A)⁺ RNA-Bindung des Tho2p-GFP Proteins um 27% in der Spleißingfaktor Mutante *prp8-908/988* detektiert. Vergleichbare Werte wurden auch in den Spleißingfaktor-Mutanten *prp17Δ* und *prp43-S247A* mit Abnahmen um 29% und 22% gemessen (Abb. 53, A u. B). Eine weitere analysierte THO-Komplex Komponente ist Mft1p. Mft1p-TAP RNA Ko-Immunopräzipitationen ergaben ebenfalls eine partielle Reduktion der mRNA Assoziationen. In *prp8-908/988* wurde eine verminderte Poly(A)⁺-Bindung von 42% detektiert. Reduzierte mRNA Assoziationen wurden auch in den Spleißingfaktor-Mutanten *prp17Δ* und *prp43-S247A* detektiert. Die prozentualen Abnahmen betrugen hier 35% und 37% (Abb. 53, A u. B).

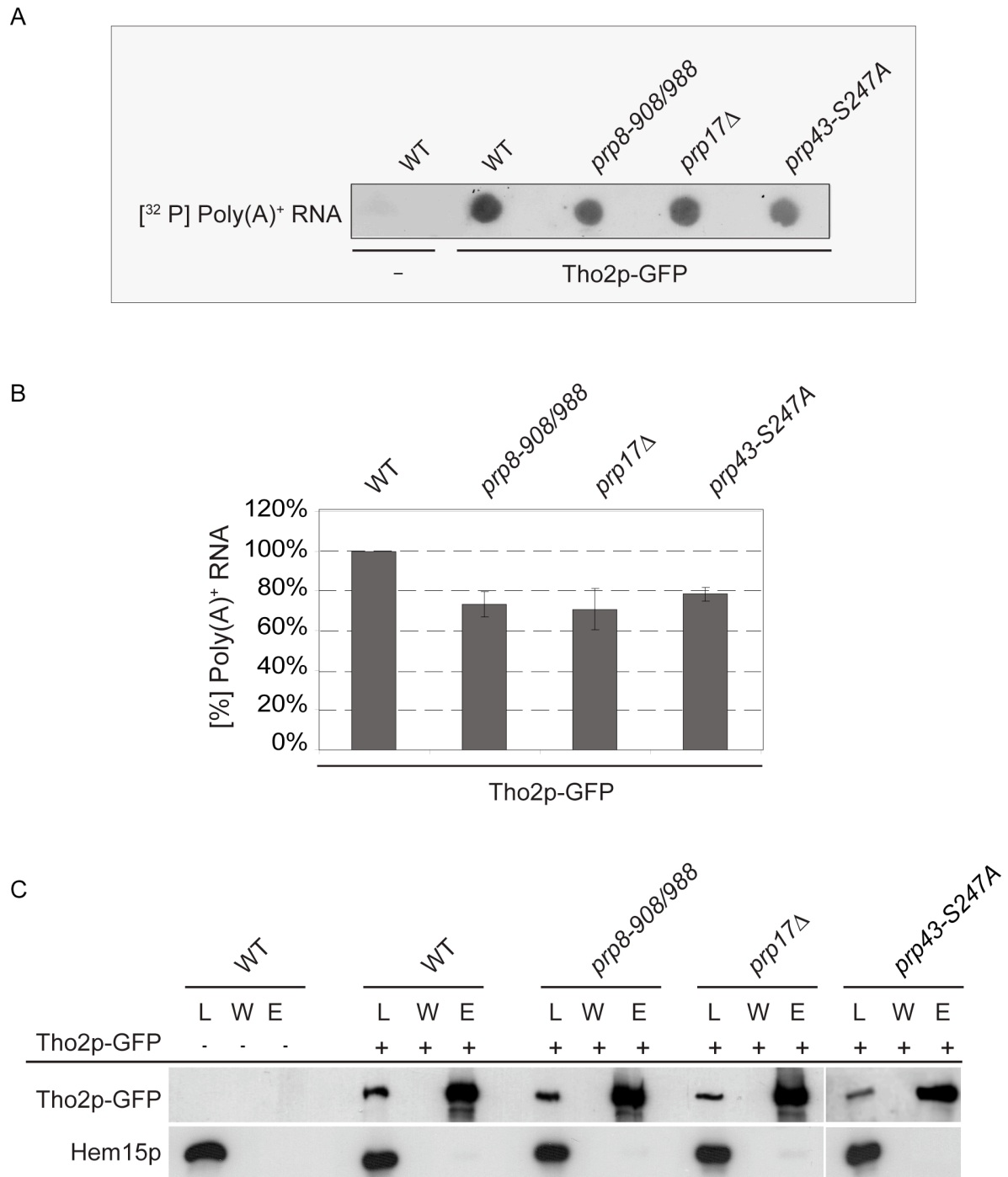


Abb. 53: Die Bindung zwischen mRNA und Tho2p-GFP ist in den Mutanten *prp8-908/988*, *prp17Δ* und *prp43-S247A* reduziert. In RNA-Ko-IP Experimenten erfolgte die Isolierung von an Tho2p-GFP gebundener RNA. Das Experiment wurde in vergleichenden Analysen in Wildtyp und in den angegebenen Spleißingfaktor-Mutanten durchgeführt. A) Gleiche Mengen eluierter RNA wurden im „Dot Blot“ Experiment analysiert. Die Detektion des Poly(A)⁺ RNA Gehalts erfolgte mittels [³²P] markierter Oligo-d(T₅₂)-Sonde. Die Stärke der [³²P] Markierung wurde im Phosphorimager analysiert und B) statistisch in drei unabhängigen Experimenten ausgewertet. C) Protein-Auftrennung im 8% Gel und Western Blot Kontrolle des im RNA-Ko-IP Experiment verwendeten Tho2p-GFP in den angegebenen Stämmen und einer mitgeführten Negativ Kontrolle ohne tag. Für die Detektionen wurden α-GFP- und α-Hem15-Antikörper verwendet.

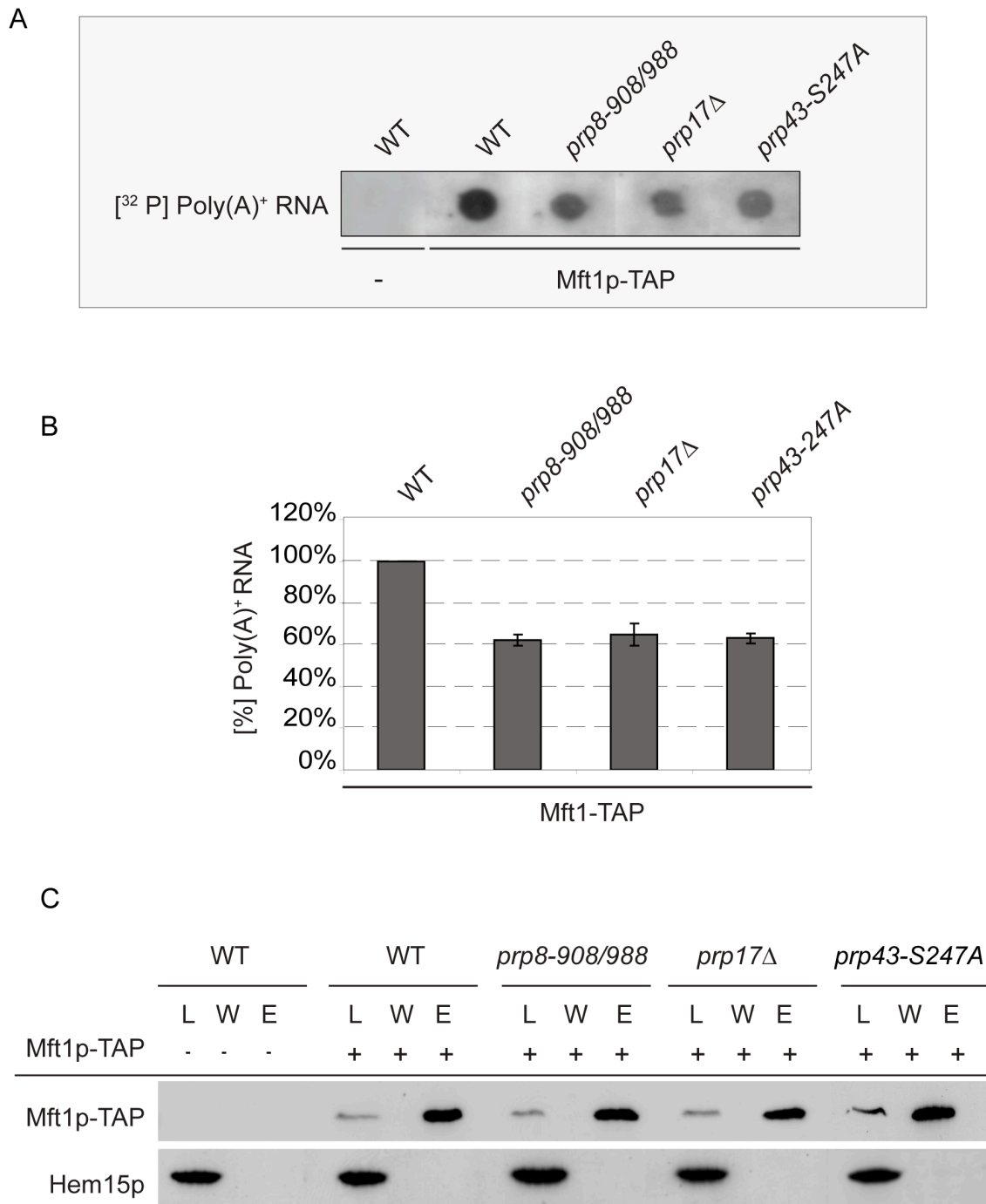


Abb. 54: Die Bindung zwischen mRNA und Mft1p-TAP ist in *prp8-908/988*, *prp17Δ* und *prp43-S247A* geschwächt. In RNA-Ko-IP Experimenten erfolgte die Isolierung von an Mft1p-TAP gebundener RNA. Das Experiment wurde in vergleichenden Analysen in Wildtyp und in den angegebenen Spleißingfaktor-Mutanten durchgeführt. A) Gleiche Mengen eluierter RNA wurden im „Dot Blot“ Experiment analysiert. Die Detektion des Poly(A)⁺ RNA Level erfolgte mittels [³²P] markierter Oligo-d(T₅₂)-Sonde. Die Stärke der [³²P] Markierung wurde im Phosphorimager analysiert und B) statistisch in drei unabhängigen Experimenten analysiert. C) Western Blot Kontrolle des im RNA-Ko-IP Experiment präzipitierten Mft1p-TAP in Wildtyp und in den angegebenen Spleißingfaktor-Mutanten. Eine Negativkontrolle ohne Protein-tag wurde im Experiment ebenfalls analysiert. Für die Detektionen wurde ein α-Protein A Bindeprotein (PAB)- und α- Hem15p-Antikörper verwendet.

Ein erst vor kurzem charakterisierter Komplex, der sowohl eine Funktion im Transkriptionsablauf übernimmt als auch die aktiv transkribierten mRNAs in die räumliche Nähe der Kernporen-Komplexe positioniert, ist der TREX-2 Komplex (1.7.5). Er besteht aus den vier Komponenten Thp1p, Sac3p, Sus1p und Cdc31p. Mutationen dieser Faktoren ähneln den Transkriptions- und mRNA Export-Defekten, die auch in Mutanten des THO-Komplexes gefunden wurden (Fischer *et al.*, 2002; Fisher *et al.*, 2004; Gallardo *et al.*, 2003; Rodriguez-Navarro *et al.*, 2004; Gonzales-Aguilera, 2008). Der Komplex selbst ist über eine Interaktion mit dem Nukleoporin Nup1p mit dem Kernporen-Komplex verankert (Dieppois & Stutz, 2010). Aufgrund der identifizierten Störungen in der mRNA-Bindung von den THO-Komplex Komponenten Tho2p und Mft1p in Spleißingfaktor-Mutanten wurde der TREX-2 Komplex im Beispiel von Thp1p in seiner mRNA Bindung in Wildtyp und in den Spleißingfaktor-Mutanten *prp8-908/988*, *prp17Δ* und *prp43-S247A* ebenfalls untersucht (Abb. 55). Thp1p verfügt über eine RNA Bindedomäne (RRM) über die eine Assoziation mit der mRNA erfolgt. Im Vergleich zur Wildtyp-Situation ist in der *prp8-908/988* Spleißingfaktor-Mutante die Assoziation zwischen mRNA und Thp1p um 27% reduziert. Dieser experimentell ermittelte Wert einer verringerten mRNA Bindung wurde auch für das THO-Komplex Protein Tho2p gefunden (Abb. 53). In *prp17Δ* kommt es zu einer vergleichbaren Verringerung der mRNA Bindung um ca. 33%. In der Mutante *prp43-S247A*, die einen Einfluß auf die Intron-Freisetzung und spleißosomale Disassemblierung nimmt, wurde im Vergleich zum Wildtyp eine 32%-ige Reduktion der mRNA Assoziation mit Thp1p identifiziert. Defekte im Spleißingprozess haben somit nicht nur einen Einfluß auf die mRNA-Bindung von THO-Komplex Komponenten (Tho2p und Mft1p) sondern auch auf den TREX-2 Komplex (Thp1p). Analoge Funktionen dieser Komplexe liegen vor allem in der Transkriptionselongation und in der unterstützenden Verbindung von Transkription und mRNA Export. Mit der Untersuchung der THO- und TREX-2-Komplex Komponenten Tho2p, Mft1p und Thp1p wird deutlich, dass im Unterschied zu Gbp2p und Hrb1p eine geringere Beeinträchtigung der mRNA Bindung vorliegt. Diese um rund ein Viertel bis ein Drittel verringerten mRNA Assoziationen sprechen dafür, dass die Rekrutierung des THO/TREX-2-Komplex zur mRNA ebenfalls vom Spleißingprozess beeinflusst wird. Die Ergebnisse der RNA-Ko-IP sprechen möglicherweise auch für eine ebenfalls Spleißing-abhängige Rekrutierung des THO/TREX-2-Komplexes für den Anteil an mRNAs, die Intronsequenzen enthalten. Der Anteil an Intron enthaltenden bzw. gespleißten Transkripten in der Zelle werden auf etwa 25%-30% berechnet (Ares *et al.*, 1999; Lopez und Seraphin, 1999).

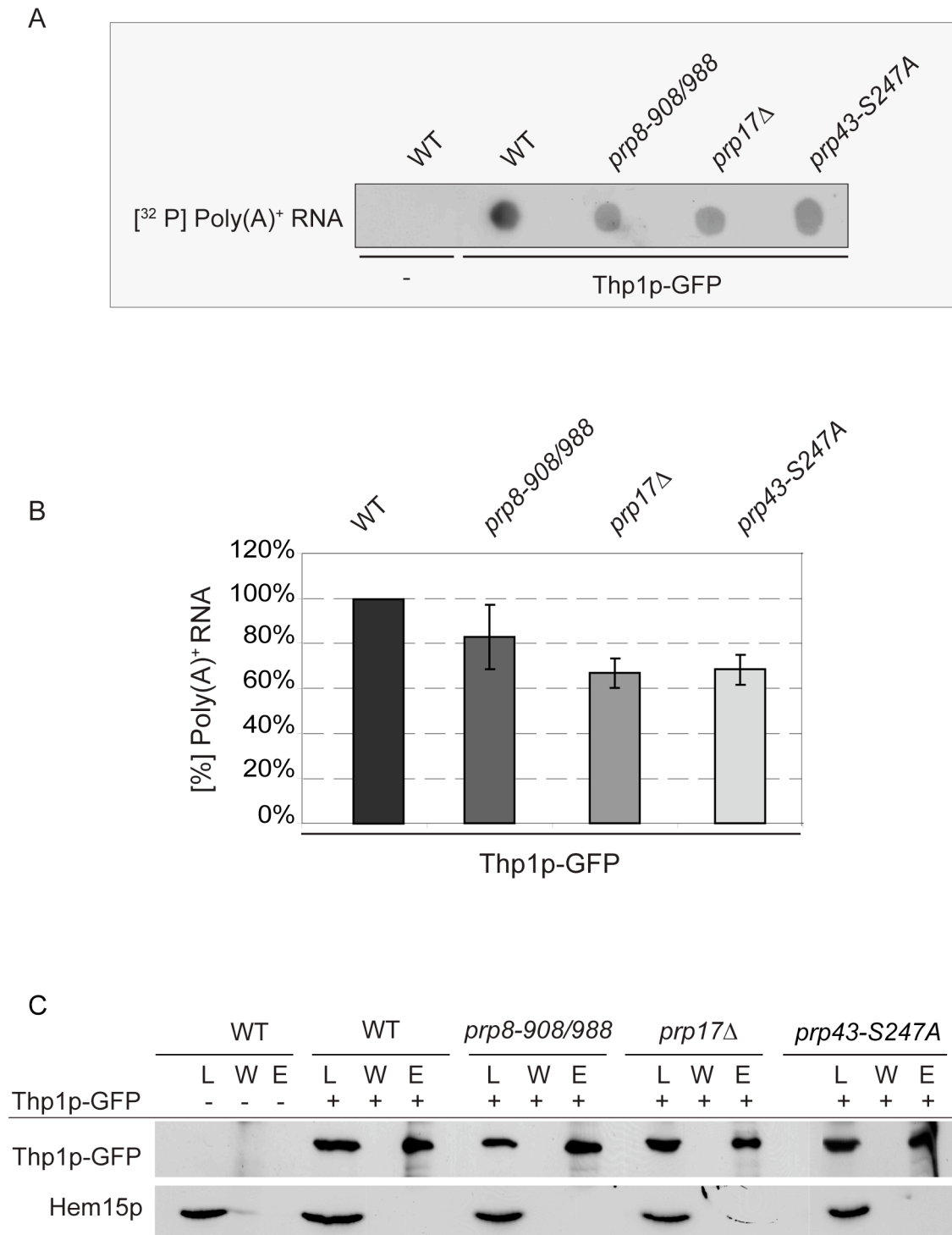
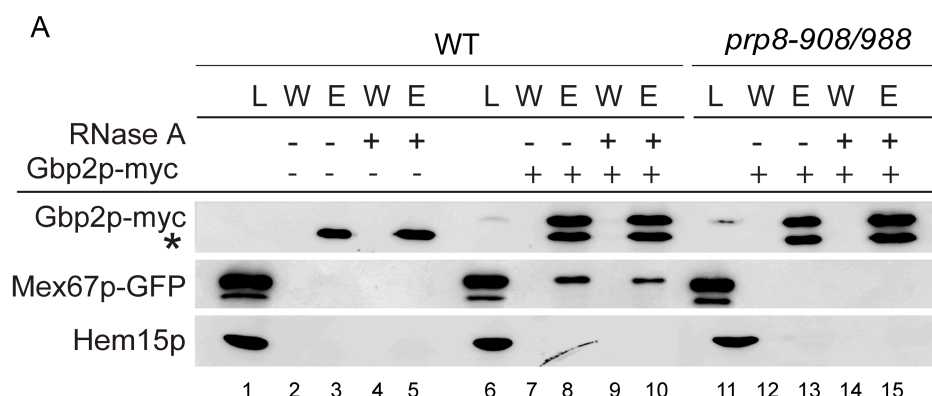


Abb. 55: Die Assoziation von mRNA mit Thp1p ist in *prp8-908/988*, *prp17Δ* und *prp43-S247A* verringert. In RNA-Ko-IP Experimenten erfolgte die Isolierung von an Thp1p-GFP gebundener RNA. Das Experiment wurden in vergleichenden Analysen in Wildtyp und in den angegebenen Spleißingfaktor-Mutanten durchgeführt. A) Gleiche Mengen eluierter RNA wurden im „Dot Blot“ Experiment analysiert. Die Detektion der Poly(A)⁺ RNA Level erfolgte mittels [³²P] markierter Oligo-d(T₅₂)-Sonde. Die Stärke der [³²P] Markierung wurde im Phosphorimager analysiert und statistisch in drei unabhängigen Experimenten analysiert (B). C) Western Blot Kontrolle des im RNA-Ko-IP Experiment präzipitierten Thp1p-GFP in Wildtyp und in den angegebenen Spleißingfaktor-Mutanten. Eine Negativkontrolle ohne Protein-tag wurde im Experiment ebenfalls analysiert. Für die Detektionen wurden ein α-GFP- und α-Hem15-Antikörper verwendet.

3.2.8 Spleißing-abhängige Rekrutierung des Export Rezeptors Mex67p an die Export Adaptoren Gbp2p und Hrb1p

Die durch Spleißingfaktor Mutanten hervorgerufene fehlende mRNA-Bindung von Gbp2p und Hrb1p würde auch die Frage aufwerfen, ob ihre Interaktion mit dem Export-Rezeptor Mex67p ebenfalls beeinträchtigt wird. Um diesen Sachverhalt zu klären, erfolgte daher eine Ko-Immunopräzipitationstudie mit myc getaggtm Gbp2p und Hrb1p und Plasmid kodiertem Mex67p-GFP in *prp8-908/988* und in *prp17Δ* (Abb. 56 und 57). Das Experiment wurde bei der nicht permissiven Temperatur von 37°C durchgeführt. In *prp8-908/988* ist die Interaktion zwischen Mex67p und Gbp2p tatsächlich vollständig unterbunden und für Hrb1p stark reduziert (Abb. 56, A, B). Die physikalische Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen Mex67p und Npl3p bleibt hingegen in *prp8-908/988* unbeeinflusst (Abb. 56, C). Eine ähnliche Beobachtung konnte in *prp17Δ* erfolgen (Abb. 57). Die physikalische Interaktion zwischen Mex67p und Gbp2p ist in Anwesenheit von RNase A in *prp17Δ* unterbunden und ohne RNase A stark geschwächt (88% ± 8%) (Abb. 57, A). Die Hrb1p-Mex67p Interaktion wird in *prp17Δ* um 72% ± 10% und mit RNase A Behandlung um 80% ± 5% reduziert (Abb. 57, B). Die Adapter-Rezeptor-Interaktion von Mex67p und Npl3p wird durch eine *prp17Δ* Deletion nicht gestört (Abb. 57, C). Zusammenfassend läßt sich an dieser Stelle festhalten, dass Gbp2p und Hrb1p offensichtlich abhängig vom Spleißingprozess zur mRNA Bindung rekrutiert werden und die mRNA Bindung von Gbp2p und Hrb1p in Spleißing-Mutanten daher stark gestört ist. Der Gbp2p und Hrb1p depletierte Zustand der mRNA verhindert auch die Ausbildung der Adapter-Rezeptor Interaktion zwischen Gbp2p/Hrb1p mit Mex67p in Spleißingfaktor- Mutanten.



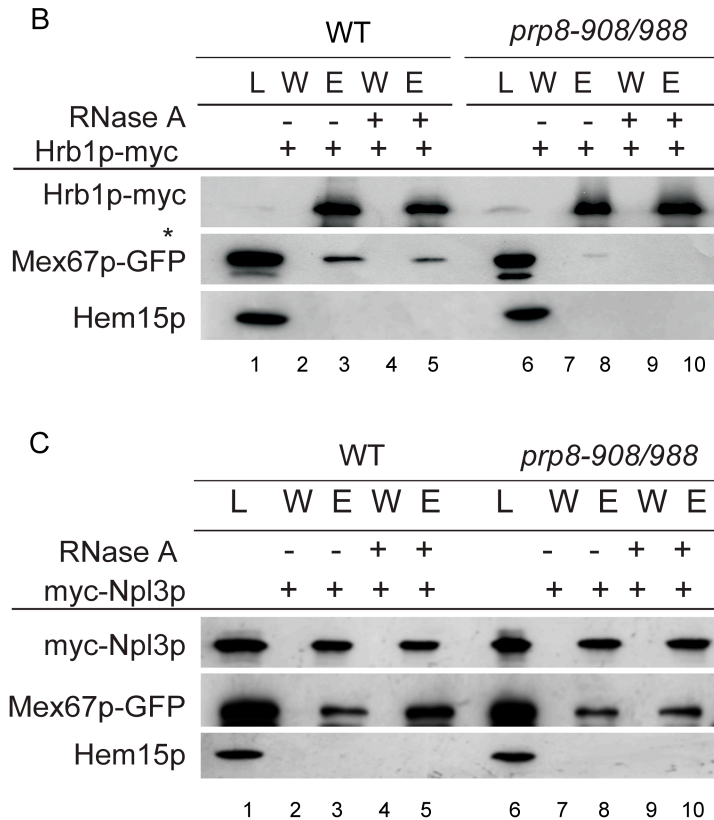


Abb. 56: Physikalische Interaktion von Mex67p mit Npl3p, Gbp2p und Hrb1p *in vivo*. Ko-Immunopräzipitations-Analysen der myc-getaggtten SR-ähnlichen Proteine zur Analyse einer Mex67p-GFP Direktinteraktion in Wildtyp und *prp8-908/988*. A/B/C) Für die Positivkontrollen wurden Wildtyp- oder *prp8-908/988*-Zellen mit Plasmid-kodiertem myc-Npl3p und Mex67p-GFP transformiert. Genomisch myc getaggtte Gbp2p und Hrb1p-Stämme wurden mit Mex67p-GFP-Plasmiden transformiert und mit dem *prp8-908/988*-Stamm gekreuzt. Für die Negativkontrollen wurden Mex67p-GFP Plasmide in Wildtypzellen eingebracht. Lysate aus Zellen der logarithmischen Wachstumsphase wurden gewonnen, die zuvor für 30 min bei 37°C inkubiert worden waren. Die SR-ähnlichen Proteine wurden mit Hilfe des α-myc-Antikörpers gebunden. Der Antikörper-Protein Komplex wurde über Protein G Plus Agarose präzipitiert. Nach fünfmaligem Waschen und Elution wurde nach SDS-PAGE (11%) und Western Blot Analyse die Präsenz des ko-präzipitierten Mex67p-GFP analysiert. Der Nachweis der myc-getaggtten Proteine erfolgte mit einem α-myc-9E10-Antikörper, während Mex67p-GFP mit einem α-GFP-Antikörper nachgewiesen wurde. Als Ladekontrolle wurde Hem15p mit einem α-Hem15 Antikörper mitanalysiert. Die Berechnung von Western-Blot Signalen erfolgte mit Hilfe des Computer-Programms ImageJ. *: Immunoglobulin-Bande („schwere Kette“). Diese Bande wird je nach Laufstrecke unterhalb der Gbp2-myc repräsentierenden Bande mit abgebildet.

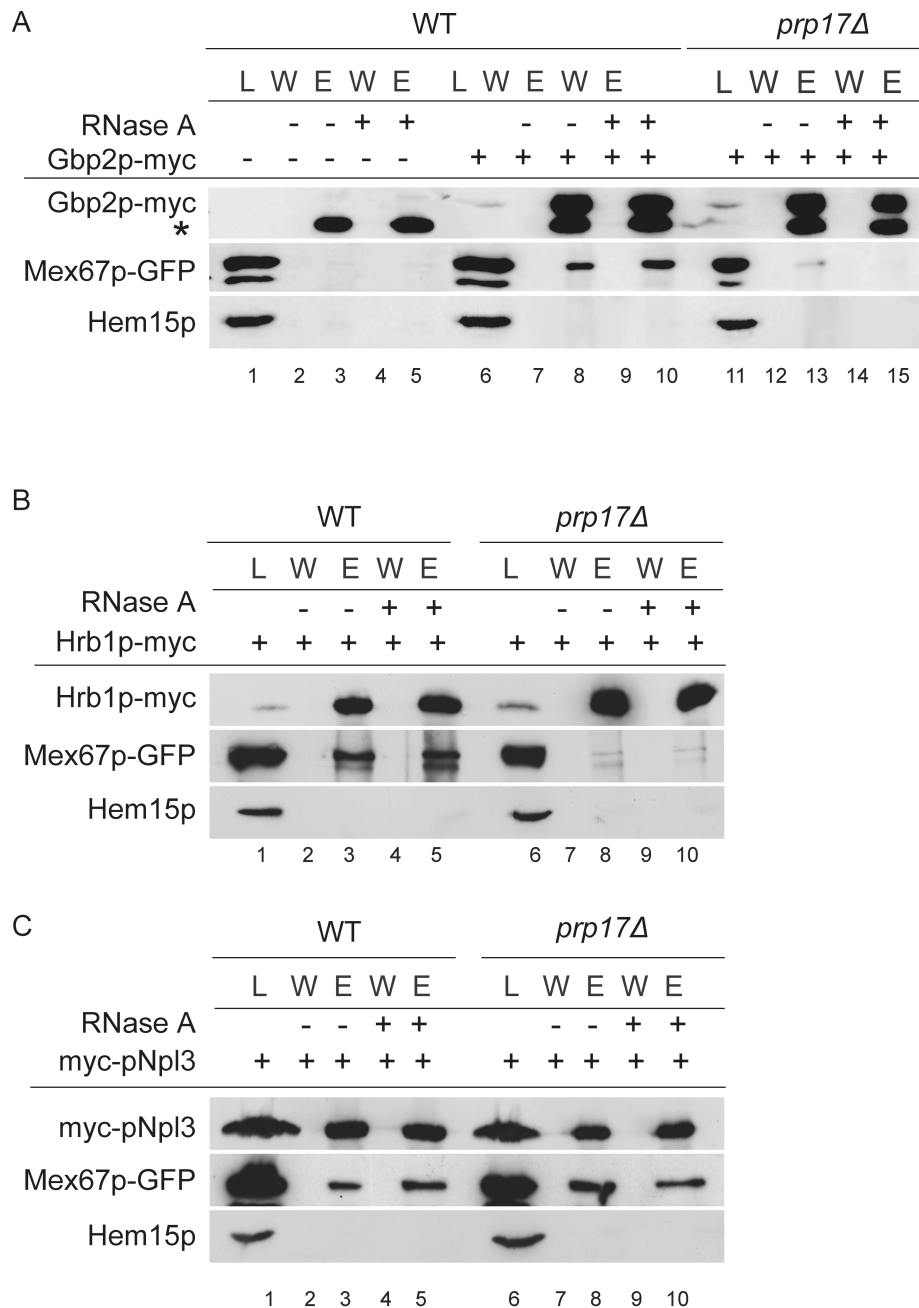


Abb. 57: Physikalische Interaktion von Mex67p mit Npl3p, Gbp2p und Hrb1p *in vivo*. Ko-Immunopräzipitations-Analysen der myc-getaggtten SR-ähnlichen Proteine zur Analyse einer Mex67p-GFP Direktinteraktion in Wildtyp und in *prp17Δ*. A/B/C) Für die Positivkontrollen wurden Wildtyp- oder *prp17Δ*-Zellen mit Plasmid-kodiertem myc-Npl3p und Mex67p-GFP transformiert. Genomisch myc getaggte Gbp2p und Hrb1p Stämme wurden mit dem *prp17Δ* Stamm gekreuzt und mit Mex67p-GFP-Plasmiden transformiert. Vor der Lysatgewinnung wurden die Zellen logarithmischer Phase einem Temperaturwechsel nach 37°C für 30min unterzogen. Die SR-ähnlichen Proteine wurden mit Hilfe des α -myc-Antikörpers gebunden. Der Antikörper-Protein Komplex wurde über Protein G Plus Agarose präzipitiert. Nach fünfmaligem Waschen und Elution wurde nach SDS-PAGE (11%) und Western Blot Analyse die Präsenz des ko-präzipitierten Mex67-GFP analysiert. Der Nachweis der myc-getaggtten Proteine erfolgte mit einem α -myc-9E10-Antikörper, während Mex67p-GFP mit einem α -GFP-Antikörper nachgewiesen wurde. Als Ladekontrolle wurde Hem15p mit einem α -Hem15 Antikörper mitanalysiert. Die Berechnung von Western-Blot Signalen erfolgte mit Hilfe des Computer-Programms ImageJ.

3.2.9 Gbp2p und Hrb1p interagieren physikalisch mit dem Kernporen-Komplex assoziierten Mlp1p

Der Mechanismus, der im Sinne einer mRNA Qualitätskontrolle den Export von nicht gespleißten mRNAs verhindert, ist bislang noch nicht vollständig aufgeklärt. Der Kernporen-Komplex assoziierte Faktor Mlp1p ist jedoch bereits bekannt dafür, dass er ungespleißte mRNAs am Export hindern kann und damit eine Kontrollfunktion übernimmt. Eine Deletion dieses nicht essentiellen *MLP1* führt entsprechend zu einer Anreicherung ungespleißter mRNAs im Zytoplasma (Galy *et al.*, 2004; Palancade *et al.*, 2005). In dieser Arbeit wurde analysiert, ob für Gbp2p und Hrb1p eine Direktinteraktion mit Mlp1p *in vivo* gezeigt werden kann (Abb. 58). In diesen Ko-IP Studien wurde eine TAP-IP mit einem entsprechenden TAP-getaggten Mlp1p-Stamm durchgeführt, der mit GFP getaggtten Gbp2p oder Hrb1p Plasmiden zuvor transformiert worden war. Tatsächlich können in den Eluatn der Mlp1p-TAP Ko-IP Signale für ko-präzipitiertes Gbp2p-GFP und auch Hrb1p-GFP detektiert werden (Abb. 58 A u. B, Spur 8 u. 10). Diese physikalischen Interaktionen sind als RNase A insensitiv und damit als Protein-Protein-Wechselwirkungen zu kennzeichnen, die nicht über RNA Strukturen vermittelt werden.

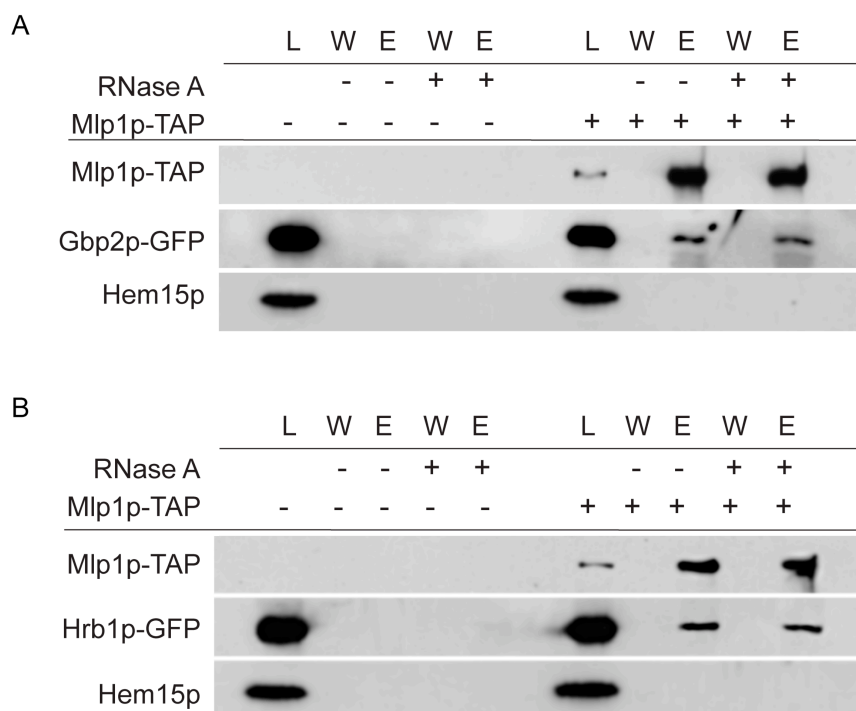


Abb. 58: Physikalische Interaktion von Mlp1p mit Gbp2p und Hrb1p *in vivo*. A u. B) Für die Positiv-Kontrollen wurde endogen getaggttes Mlp1p-TAP mit Gbp2p-GFP oder Hrb1p-GFP Plasmiden transformiert. Für die Negativkontrolle wurde ein Wildtyp-Stamm mit den entsprechenden GFP-getaggtten SR-ähnlichen Proteinen transformiert. Die TAP-Immunopräzipitation erfolgte unter Verwendung von IgG-Sepharose „Beads“ und Zellen logarithmischer Wachstumsphase. Nach der Ko-IP erfolgte die Proteinauftrennung im Gradienten-Gel (12%/9%/6%). Die Anwesenheit von ko-präzipitiertem- Gbp2p-GFP oder Hrb1p-GFP erfolgte mittels Detektion mit α -GFP-Antikörpern. Mlp1-TAP wurde über einen α -PAB-Antikörper nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde Hem15p mit einem α -Hem15p Antikörper detektiert.

3.2.10 Physikalische Protein-Protein Wechselwirkungen von Gbp2p mit Hrb1p

Schließlich wurde aufgrund der vorgefundenen besonderen additiven Effekte, die von der Doppel-Deletion *gbp2Δ hrb1Δ* ausgehen, untersucht, ob eine physikalische Interaktion zwischen Gbp2p und Hrb1p besteht. In Ko-IP Studien wurde das myc-getaggte Gbp2p immunpräzipitiert. Der Nachweis der physikalischen Interaktion erfolgte über das Plasmid-kodierte Hrb1p-GFP. Auch hier erfolgte standardmäßig die Durchführung einer Ko-IP in An- und Abwesenheit von RNase A. In den Gbp2p-myc-Ko-IP Studien kann eindeutig eine Direktinteraktion über den Nachweis des ko-präzipitierenden Hrb1p-GFP gezeigt werden (Abb. 59, Spur 8 u. 10). Die Interaktion wird in Anwesenheit von RNase A nicht beeinträchtigt (Abb. 59, Spur 10) und führt damit zur Identifizierung einer RNA unabhängigen Protein-Protein-Wechselwirkung von Gbp2p mit Hrb1p.

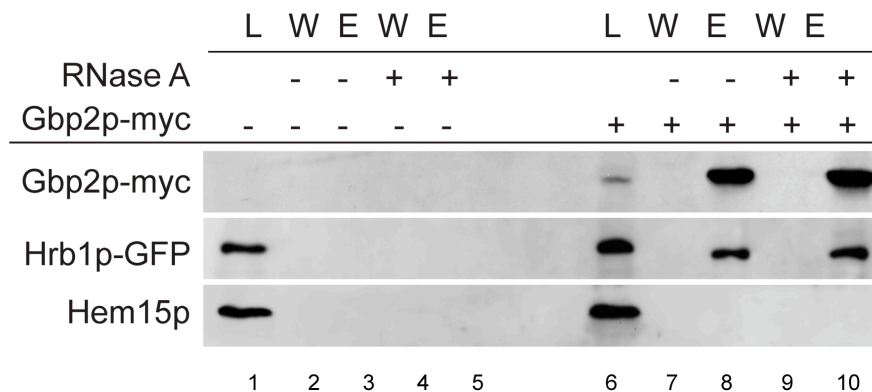


Abb. 59: Physikalische Interaktion von Gbp2p und Hrb1p *in vivo*. Für die Positivkontrollen wurde ein endogen myc-getaggtter Gbp2p-Stamm mit Hrb1p-GFP-Plasmiden transformiert. Für die Negativkontrolle wurde ein Wildtyp-Stamm mit Hrb1p-GFP transformiert. Die myc-Immunopräzipitation erfolgte unter Verwendung von G-Sepharose „Beads“ und Lysatproben aus Zellen in logarithmischer Wachstumsphase. Die Anwesenheit von ko-präzipitiertem Hrb1p-GFP erfolgte mittels Detektion mit einem α -GFP-Antikörper. Gbp2p-myc wurde über einen α -myc-9E10-Antikörper nachgewiesen. Als Ladekontrolle und um unspezifische Bindungen zu überprüfen, wurde Hem15p mit einem α -Hem15 Antikörper detektiert.

3.2.11 Gbp2p und Hrb1p binden Transkripte, die gespleißt werden

In RNA Ko-IP vermittelten Microarray Studien (RIP-Chip) wurden die durch Gbp2p und Hrb1p spezifisch gebundenen mRNAs identifiziert. Mit Hilfe von endogen myc getaggttem Gbp2p und Hrb1p wurden zunächst RNA-Ko-IPs durchgeführt (Abb. 60). Als Negativkontrolle wurde ein Wildtyp-Stamm, der keinen Protein-tag enthält, mitgeführt. Die ko-präzipitierten RNAs wurden in ihrer Qualität mittels Experion™ Analyse überprüft und die mRNA amplifiziert.

RNA-Ko-Immunopräzipitation (RIP-Chip)

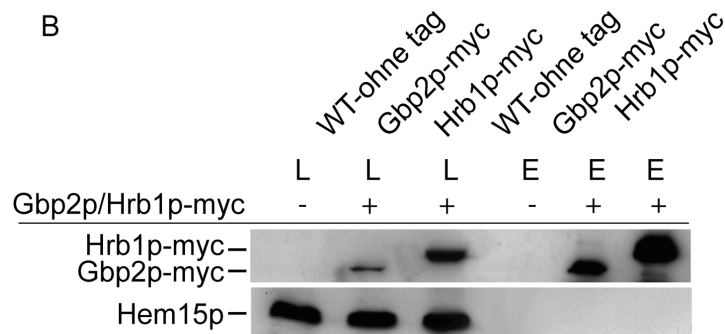
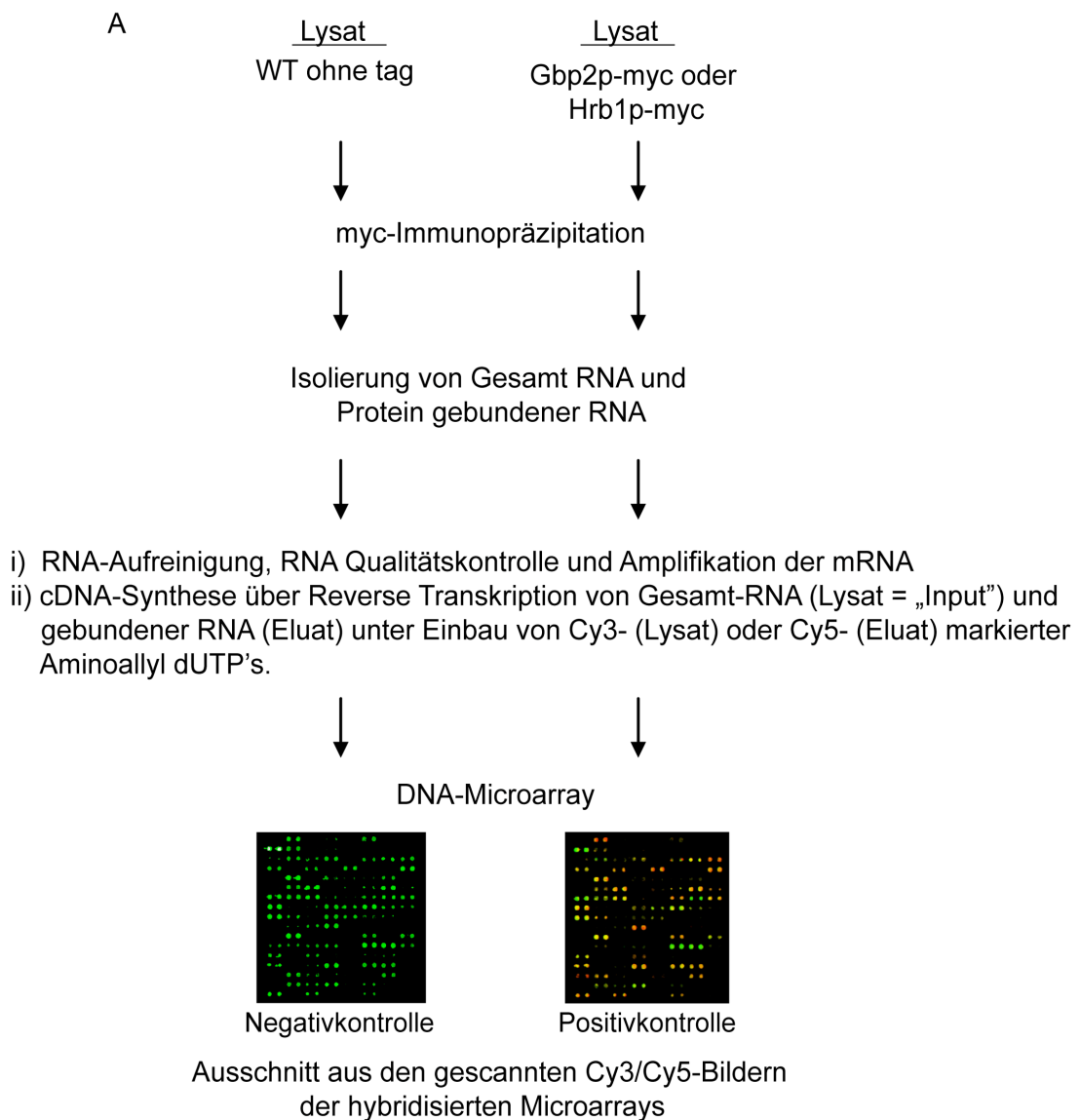


Abb. 60: Schematische Darstellung der cDNA-Microarray Experimentanordnung zur Identifizierung von Gbp2p-myc oder Hrb1p-myc assoziierten mRNAs. A) Gbp2p-myc oder Hrb1p-myc sowie ein ungetaggtter Wildtypstamm wurden immunopräzipitiert, die ko-präzipitierte RNA isoliert und die mRNA amplifiziert. Nach reverser Transkription und Cy3-/Cy5-Markierung der Eluat- und Lysatproben erfolgte die cDNA Microarray Analyse. B) In Western Blot Analysen erfolgte die Detektion der in der RNA-Ko-IP präzipitierten myc-getaggtten Proteine sowie von Hem15p unter Verwendung von α -myc- und α -Hem-15-Antikörpern.

Anschließend erfolgte in der reversen Transkription die cDNA-Synthese unter Inkorporation von Cy3/Cy5-markierten Aminoallyl dUTP's. Die jeweilige Lysatprobe, die das Vorkommen der Gesamt-mRNA vorgibt, wurde mit dem Cy3-Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die korrespondierende Probe aus der RNA Eluat Fraktion wurde Cy5-markiert. Diese markierten Proben wurden mit „Yeast Microarray Chips“ (Y6.4k) hybridisiert (2.11.8). Nach dem Entfernen überschüssigen, nicht hybridisierten Materials wurden die Arrays eingescannt. Die Array Daten wurden nach der Intensität des Cy5-markierten Eluatsignals im Vergleich zur Cy3-markierten Gesamt-mRNA Referenz nach einer Rangliste geordnet. Die P-Werte zur statistischen Signifikanz wurden mittels des hypergeometrischen Test/Fischer's Exakt Test gegen eine Null-Hypothese nach zufällig gewählten 100 Genen analysiert. Auswertung der Microarrays erfolgte in zwei unabhängigen Experimenten. Die Top 100 Gene der Rangliste wurden in ihrer biologischen Funktion analysiert und zu funktionellen Subgruppen zusammengefaßt. Die jeweils gebundenen Subgruppen der ersten 100 Gene der Rangliste wurden in einem Tortendiagramm dargestellt (Abb. 61 u. 62).

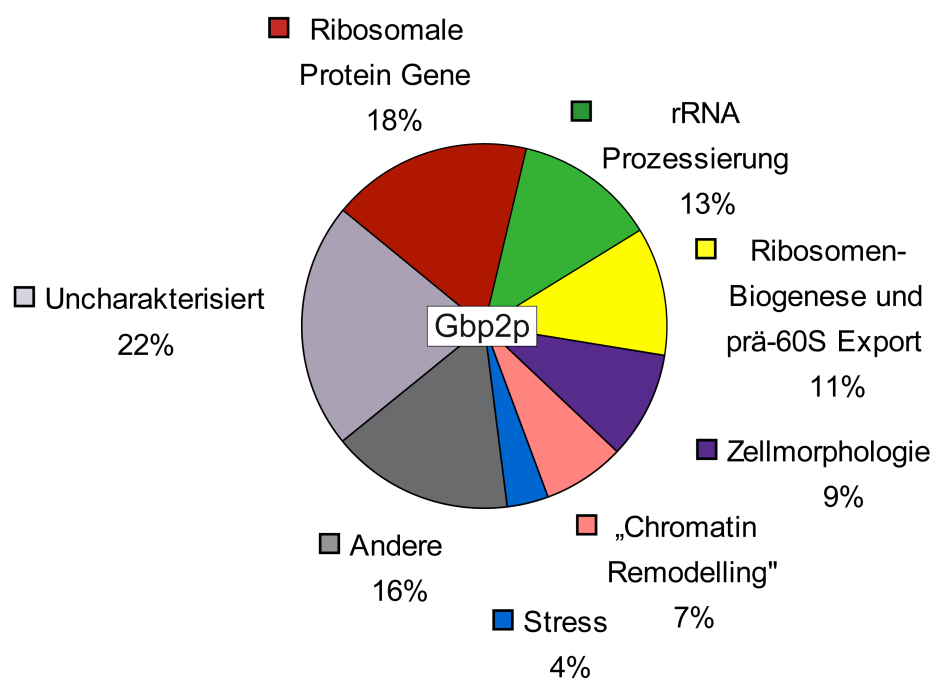


Abb. 61: Microarray basierte Analyse von Gbp2p assoziierten mRNA-Subgruppen der Top 100 nach Rangliste. Die identifizierten Gene wurden nach ihrer molekularbiologischen Funktion in funktionelle Subgruppen geordnet. Die funktionelle Charakterisierung der identifizierten Gene erfolgte mit Hilfe der „Saccharomyces Genome Database“ und „DAVID Bioinformatics Resources“ Internet-Datenbanken. Die Top 100 Ergebnislisten sind mit der Zugangsnummer GSE20738 in der Microarray-Datenbank unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/> eingegeben worden.

Nahezu ein Viertel der analysierten Gbp2p assoziierten Gene sind noch uncharakterisiert (Abb. 61). Als dominierende Gruppe mit einem Anteil von 18% wurden die ribosomalen Protein Gene identifiziert, von denen 78% Introns enthalten. Weitere dominierende Gruppen sind diejenigen der rRNA Prozessierungsfaktoren mit 13% und Faktoren, die in der Ribosomen-Biogenese und dem Export der prä-60S Untereinheit involviert sind (11%) (Abb. 61). Alle drei Gruppen lassen sich mit 42% zu einer übergeordneten Gengruppe zusammenfassen, die einen direkten Beitrag zur Ribosomen-Biogenese leisten oder selbst Bestandteil des Ribosoms sind.

mRNAs, die über eine Hrb1p-myc spezifische RNA Ko-IP und nachfolgender Microarray-Analyse identifiziert wurden, zeigen ähnliche Tendenzen der Anreicherung von funktionellen Subgruppen. So ist die Gruppe der rRNA Prozessierungsfaktoren mit einem Anteil von 23% innerhalb der Top 100 der Rangliste am stärksten vertreten. 17% der stark gebundenen mRNAs gehört zur funktionellen Gruppe der in der Ribosomen-Biogenese und im Export der prä-60S Partikel involvierten Faktoren. Ribosomale Protein Gene sind mit 10% vertreten (Abb. 62). Alle drei Gruppen leisten mit 50% aller identifizierten Faktoren einen Beitrag zur Ribosomen-Biogenese oder sind selbst Bestandteil dieser makromolekularen Komplexe.

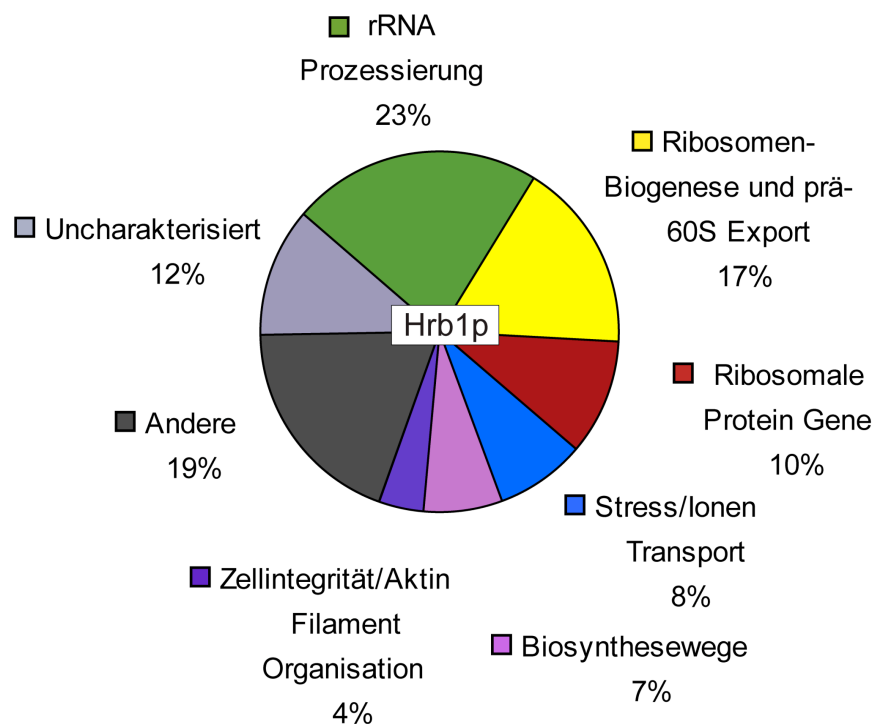


Abb. 62: Microarray basierte Analyse von Hrb1p assoziierten RNA-Subgruppen der ersten Top 100 nach Rangliste. Die identifizierten Gene wurden nach ihrer molekularbiologischen Funktion in funktionelle Subgruppen geordnet. Die funktionelle Charakterisierung erfolgte mit Hilfe der „*Saccharomyces* Genome Database“ und „DAVID Bioinformatics Resources“ Datenbank. Die Top 100 Ergebnislisten sind mit der Zugangsnummer GSE20738 unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo> eingegeben worden.

Ein Vergleich der identifizierten Top 100 Gene/gebundenen mRNAs aus Gbp2p und Hrb1p RNA-Ko-IP und Microarray Studien ergeben somit eine starke Übereinstimmung in den gebundenen funktionellen Subgruppen (Abb. 61 u. 62), während nur eine partielle Übereinstimmungen in identischen Genen besteht (19%).

Zusätzlich erfolgte die Microarray basierte Analyse einer Anreicherung von Intron-haltigen Genen innerhalb der identifizierten Top 100 Gene. Aus den Top 100 Genen der Gbp2p RNA-Ko-IP Rangliste enthalten $19\% \pm 0,7\%$ Intronsequenzen. Für die Hrb1p RNA-Ko-IP wurden $12\% \pm 3,5\%$ Intron-haltige Gene identifiziert (Abb. 58). Im Gesamt-Genom von *S. cerevisiae* existieren knapp 5% an Genen, die sich durch Intronsequenzen auszeichnen. Dies bedeutet, dass eine besondere Anreicherung von gebundenen Intron-haltigen Genen für Gbp2p und zu einem geringeren Anteil auch für Hrb1p besteht. In bereits durchgeführten RNA-Ko-IP Studien für getaggtetes Npl3p (Guisbert *et al.*, 2005) wurde für diese Arbeit in einer gleichsam durchgeführten statistischen Analyse in den ersten 100 Genen der Rangliste nur 7% Intron-haltiger Gene identifiziert, die spezifisch von Npl3p gebunden werden (Statistische Analysen von Florian Finkernagel, IMT, Philipps-Universität Marburg). Diese Prozentzahl reflektiert eher den generell vorkommenden Anteil an Intron-haltigen Genen und deutet weniger auf eine Spezifität für die Bindung von Intron-haltigen Genen durch Npl3p hin.

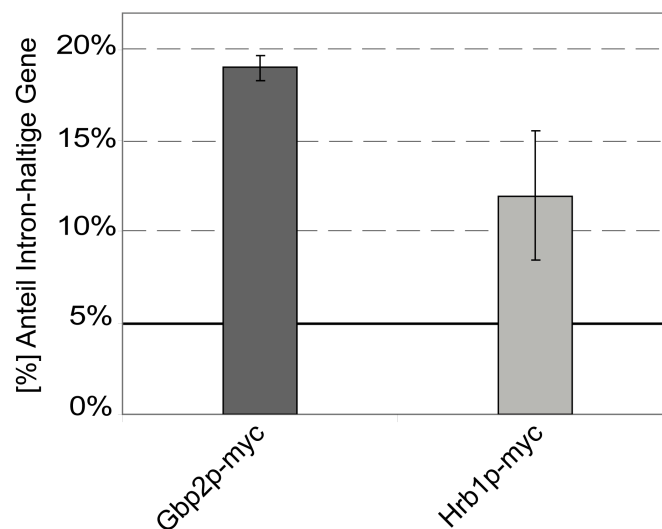


Abb. 63: Anreicherung von Intron-haltigen Transkripten nach Gbp2p oder Hrb1p RNA-Ko-IP und Microarray-Analyse. Der Anteil an Intron-haltigen Genen für Gbp2p und Hrb1p aus den Top 100 der Rankliste sind graphisch dargestellt und resultieren aus jeweils zweifach ausgeführten unabhängigen Experimenten. Die jeweils berechneten P-Werte betragen für die Gbp2p-myc RNA Ko-IP's $2,57 \times 10^{-6}$ und $5,65 \times 10^{-7}$. Für die Hrb1p-myc RNA-Ko IP's betragen die P-Werte $5,45 \times 10^{-4}$ und $7,13 \times 10^{-2}$.

Für die Validierung der Microarray basierten These einer präferentiellen Bindung von Intron-haltigen Genen durch Gbp2p und Hrb1p erfolgten qRT-PCR Analysen. Aus der Top 100

Rangliste, der in der Gbp2p-myc RNA Ko-IP identifizierten Gene wurden im Beispiel die sechs Intron-haltigen Gene *RPS6A*, *RPS23A*, *RPL23A*, *RPL17B*, *RPL30A* und *MMS2* und die Intron-losen Gene *RPS12*, *SLK1* und *CBS1* analysiert. Die aus dem RNA-Ko-IP Lysat gewonnene RNA wurde als Input-Kontrolle zur Analyse der basalen Expression herangezogen. Liegt eine RNA Anreicherung in den Eluaten gegenüber der Lysat/„Input“-Kontrolle vor, so betragen die Expressionswerte $\geq 100\%$. Als Kontrolle wurde die RNA aus dem ohne Protein-tag vollzogenen Negativexperiment mitgeführt. Wie in der Abbildung 64 zu erkennen ist, liegt eine deutliche Anreicherung für die Intron-haltigen ribosomalen Gene vor. Eine etwa 4-fache Anreicherung gegenüber der Lysatkontrolle wird für das Gen *RPS6A* detektiert. Eine etwa 2,5-fache Anreicherung gegenüber der basalen Lysat-Expression kann ebenfalls für die Gene *RPS23A*, *RPL23A* und *RPL17B* analysiert werden (Abb. 64). *RPL30A* ist im Gbp2p spezifischen RNA-Eluat zu 210% angereichert, während für *MMS2* eine Anreicherung analysiert wurde, die dem Expressionslevel der Lysatkontrolle entspricht (100%) (Abb. 64). Interessanterweise kann in der qRT-PCR Analyse für die Intron-losen Gene *RPS12*, *SLK1* und *CBS1*, die in der Top 100 Rangliste des Microarrays identifiziert worden waren, keine spezifische Anreicherung im Eluat nach qRT-PCR-Analyse festgestellt werden. Im Gegenteil, die Expressionen für die entsprechenden ko-präzipitierten mRNAs liegen deutlich unterhalb der „Input“-Kontrolle.

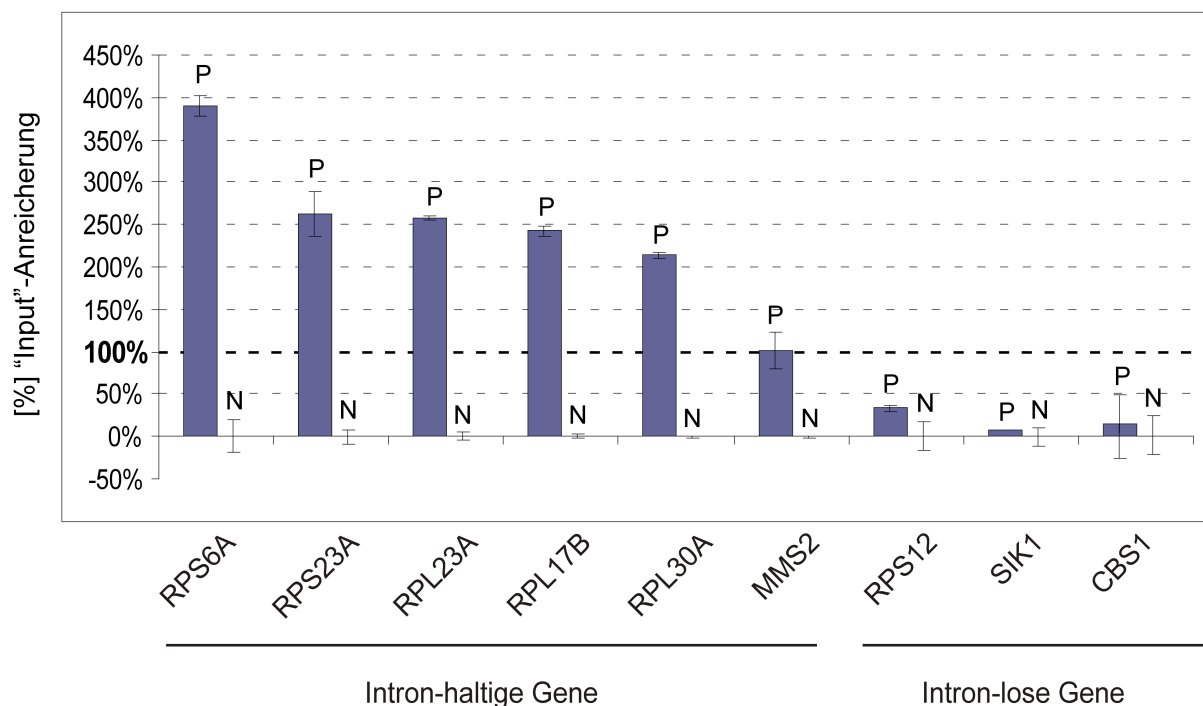


Abb. 64: Gbp2p bindet Intron-haltige Gene. Nach Gbp2p-myc RNA-Ko-IP Studien wurden ko-präzipitierte RNAs und Lysat RNA aus Positiv- und Negativkontrolle in cDNA umgeschrieben und in der qRT-PCR analysiert. Die Expressionsspiegel, angegeben als „cycle threshold“ (Ct-Wert) wurden in Triplikaten nach der ΔC_t -Berechnung in das Verhältnis zum Referenzwert (Lysat/„Input“) gesetzt. Die Anreicherungen sind in Prozentwerte angegeben. P = Gbp2p-myc-RNA-Ko-IP; N = RNA-Ko-IP Negativkontrolle (ohne tag).

Somit erhärten sich die Hinweise für eine präferentielle Bindung von Intron-haltigen mRNAs durch Gbp2p. Im Falle der von Hrb1p spezifisch gebundenen mRNAs nach RNA Ko-IP Studien kann ebenfalls eine Anreicherung Intron-haltiger Gene gezeigt werden (Abb. 65). Eine besonders starke Anreicherung wird für *RPL30A* mit einer fast 4-fachen Anreicherung gefunden. Eine etwas weniger starke Anreicherung im Verhältnis zur Lysat-Kontrolle wird mit Werten von 180% und 130% für *RPS6A* und *RPS23A* gefunden. *MMS2* als weiteres Intron-haltiges Gen bleibt mit 70% unter den basalen Expressionswerten der „Input“-Kontrolle. Deutlich wird jedoch auch hier, dass die analysierten Intron-losen Gene *RPS12*, *SIK1* und *CBS1* nach qRT-PCR Analyse nicht in den Eluatn der RNA Ko-IPs angereichert sind (Abb. 65).

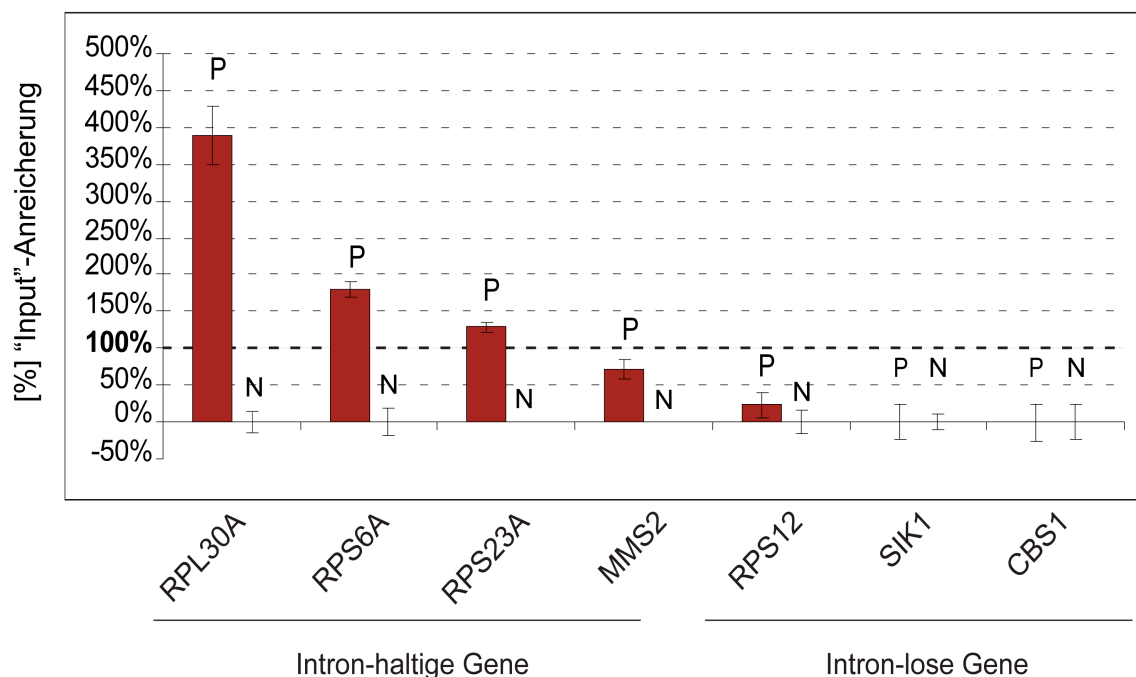


Abb. 65: Hrb1p bindet Intron-haltige Gene. Nach Hrb1p-myc RNA-Ko-IP Studien wurden ko-präzipitierte RNA und Lysat RNA aus Positiv- und Negativkontrolle in cDNA umgeschrieben und in der qRT-PCR analysiert. Die Expressionslevel, angegeben als Ct-Werte wurden in Triplikaten nach der Δ Ct-Berechnung ins Verhältnis zum Referenzwert (Lysat/„Input“) gesetzt. Die Anreicherungen sind in Prozentwerte angegeben. P = Hrb1p-myc-RNA-Ko-IP; N = RNA-Ko-IP Negativkontrolle (ohne tag).

Die in diesem Ergebnisabschnitt 3.2 gezeigten Daten haben über die Anwendung einer „Screening“ Methode zu Identifizierung der Spleißingfaktor Mutanten *prp8-908/988* und *prp17Q336** geführt, deren Defekte zu einem Export-Block von Gbp2p und Hrb1p führen. Im Gegensatz dazu, bleibt die Lokalisation von Npl3p in diesen Spleißingfaktor-Mutanten unbeeinflusst. In Microarray und nachfolgenden qRT-PCR basierten Analysen von Gbp2p- und Hrb1p-mRNA Komplexen wurde eine Präferenz für die Bindung von Intron-haltigen Transkripten festgestellt. Gbp2p und Hrb1p interagieren darüberhinaus genetisch und

physikalisch mit Spleißingfaktoren der katalytischen Spleißing-Spätphase. Wenn auch ein genereller mRNA Export-Defekt in Deletionen von *gbp2Δ* und *hrb1Δ* nicht visualisiert werden konnte, so kommt es doch zu starken additiven mRNA Export-Defekten in der Kombination mit den Spleißingfaktor-Mutanten *prp8-908/988* und *prp17Δ*. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass eine Rekrutierung dieser SR-ähnlichen mRNA Bindeproteine an die mRNA offenbar Spleißing-abhängig erfolgt. Während THO- und TREX-2-Komplex Faktoren um rund ein Drittel reduzierte mRNA Assoziationen in Spleißingfaktor-Mutanten aufweisen, ist die mRNA Bindung von Gbp2p und Hrb1p um mehr als ~ 80% massiv verringert. Ebenso führt in der Kette der Exportfaktor Rekrutierung eine mangelnde mRNA-Assoziation von Gbp2p und Hrb1p in Spleißingfaktor-Mutanten auch zu einer mangelnden Adapter-Interaktion von Gbp2p und Hrb1p mit dem Export-Rezeptor Mex67p. Gbp2p und Hrb1p interagieren darüberhinaus physikalisch mit Mlp1p, einem Kernporen-Komplex assoziierten Faktor, der eine Funktion in der Qualitätskontrolle von gespleißten mRNAs übernimmt, kurz bevor diese den Zellkern verlassen können.

4.0 Diskussion

Die Trennung von Transkription und Translation durch die zelluläre Kompartimentierung erfordert den selektiven Transport von Proteinen und mRNA zwischen Zellkern und Zytoplasma. Auf dem Weg der Genexpression erfolgt die nukleäre Transkription der mRNA, die extensive Prozessierungen erfährt und während dieser Prozesse mit einer Vielzahl von mRNA Bindeproteinen assoziiert vorliegt. Die mRNA Reifungsprozesse umfassen die 5' Methylguanosin-Kappenstrukturbildung, das Spleißen der Intronsequenzen und die 3' Polyadenylierung, die Voraussetzung für die Entstehung translatierbarer und Export kompetenter mRNAs sind. Viele Prozessierungen und mRNA Assoziationen mit spezifischen Faktoren, die die Assemblierung zum Export kompetenten mRNP Komplex vorantreiben finden ko-transkriptional statt. Diese sequenzielle Koordination von Transkription, Prozessierung und Rekrutierung von Exportfaktoren ist das Grundcharakteristikum der Export kompetenten mRNP Komplex Bildung im Zellkern. Unvollständig prozessierte oder falsch gefaltete mRNP Komplexe, die dennoch unkontrolliert in das Zytoplasma gelangen, führen häufig zur Translation fehlerhafter Genprodukte, die toxisch wirken können und letztlich Ursache für eine Vielzahl von Erkrankungen sein können (1.7.5).

In dem eukaryontischen Modellorganismus *S. cerevisiae* sind eine Reihe von bereits identifizierten mRNA Bindeproteinen bekannt, die als Bestandteil des Export kompetenten mRNP Komplexes den Zellkern durch die Kernporen-Komplexe verlassen. Nach dem Erfüllen ihrer Funktion dissoziieren diese mRNA Bindeproteine von der RNA ab und werden über spezifische Importrezeptoren zurück in den Zellkern transportiert. Bekannte pendelnde mRNA Bindeproteine sind sowohl Pab1p, die "Cap binding complex" Proteine Cbp20p und Cbp80p, Dbp5p, Nab2p, Hrp1p als auch die Gruppe der SR-ähnlichen Proteine Npl3p, Gbp2p und Hrb1p (Brodsky & Silver, 2000; Hector *et al.*, 2002; Estruch & Cole, 2003; Sachs & Kessler 1998; Häcker & Krebber, 2003; Lee *et al.*, 1996; Lewis *et al.*, 1996).

Die Gruppe der SR-ähnlichen Proteine bindet mRNA im Zellkern und begleitet diese im Verband des mRNP Komplexes durch die Kernporen-Komplexe hindurch in das Zytoplasma (Windgassen & Krebber, 2003; Häcker & Krebber, 2003; 1.10-1.12). Alle drei SR-ähnlichen Proteine weisen im Vergleich zu anderen mRNA Bindeproteinen wie z.B. Nab2p und Hrp1p eine lange mRNA Assoziation auf, die noch während der Translationselongation im Zytoplasma bestehen bleibt (Windgassen *et al.*, 2004). In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Charakterisierung der Exporteigenschaften der SR-ähnlichen Proteine Npl3p, Gbp2p und Hrb1p. Für Gbp2 und Hrb1p wurde in dieser Arbeit eine spezifische Funktion im Transport gespleißter mRNAs postuliert, während für Npl3p eine Funktion im Transport der prä-60S Untereinheit neu identifiziert wurde.

4.1 Npl3p ist ein neu identifizierter Export relevanter Faktor für den Transport der prä-60S Untereinheit

Npl3p sticht aus der Gruppe der SR-ähnlichen Proteine hervor durch seine besondere Übereinstimmung mit SR- und RRM Domänenanordnungen, so wie sie für das SR-Protein ASF/SF2 der höheren Eukaryonten gefunden wurden (1.8-1.9). Npl3p interagiert wie das SR-Protein ASF/SF2 mit dem Export-Rezeptor Mex67p (TAP in höheren Eukaryonten), der die Translokation des mRNP gekoppelt an Mtr2p durch die Kernporen-Komplexe vermittelt. Des weiteren erhöht eine Glc7p vermittelte Npl3p Dephosphorylierung die Bindungsaffinität zum Rezeptor Mex67p (Gilbert & Guthrie, 2004). Viele Npl3p-Mutanten, die Mutationen in den RRM Domänen aufweisen, zeigen z.T. starke nukleäre mRNA Export Defekte (Lee *et al.*, 2001; Abb. 10, Tab. 4). Auf der anderen Seite führen Mutationen in der SR-Domäne (*np13-27*), die die koordinierte Mtr10p vermittelte mRNA Dissoziation von Npl3p im Zytoplasma stören, zu keinen mRNA Export-Defekten, jedoch zu starken repressiven Auswirkungen auf die Translationseffizienz (1.10; Windgassen *et al.*, 2004). Des Weiteren konnte für Gbp2p, Hrb1p und Npl3p eine Ko-Sedimentation mit Polysomen nachgewiesen werden, welche Hinweise für eine lange mRNA-Assoziation noch während der Translationselongation im Zytoplasma lieferte (Windgassen *et al.*, 2004). Die Idee einer direkten oder indirekten Funktion für Npl3p in der Translation wurde daher vorgeschlagen und sollte näher analysiert werden. Eine Deletion von *NPL3*, die als überlebensfähig, aber wachstumsdefekt im Stammhintergrund *BY4741* charakterisiert wurde (Abb. 9), ist z.B. in dem *S288C* Stammhintergrund nicht überlebensfähig. Diese Unterschiede können auf genetische Variationen oder Genexpressions-Variabilitäten in den unterschiedlichen *S. cerevisiae* Stämmen beruhen, die zu Verlagerungen der Funktionsschwerpunkte einzelner Gene führen können (Schacherer *et al.*, 2007; <http://www.yeastgenome.org>). Da bislang nur wenige Deletionsstudien für Npl3p durchgeführt worden sind (McBride *et al.*, 2007; Kress *et al.*, 2008) und eine mögliche Funktion von Npl3p auch in der Translation nicht mehr ausgeschlossen wurde, erfolgte die Durchführung einer generellen *np13Δ* Funktionsanalyse im *BY4741*-Stammhintergrund. Obwohl Npl3p über viele Jahre als essentiell für den mRNA Export charakterisiert wurde, konnten in *np13Δ* erstaunlicherweise keine mRNA Export-Defekte visualisiert werden (Abb. 11). Die in der RNA-Bindedomäne (RRM) 1 und 2 defekte *np13-17* Mutante, die Plasmid kodiert in *np13Δ* Zellen eingebracht wurde, führte dominant negativ ebenfalls zu mRNA Export-Defekten. Diese mRNA Akkumulationen im Zellkern sind jedoch weniger stark ausgeprägt (Abb. 11). Es wird deutlich, dass Npl3p im *BY4741*-Stammhintergrund keine essentielle Funktion im mRNA Export übernimmt. Möglicherweise übernehmen andere mRNA Bindeproteine wie z.B. die verwandten SR-ähnlichen Proteine Gbp2p und/oder Hrb1p die Funktionen von Npl3p im mRNA Export. Dafür sprechen genetische Interaktionsstudien, die zeigen, dass eine Triple-Deletion aus *np13Δ gbp2Δ hrb1Δ*

sowohl bei 25°C als auch bei 37°C nicht mehr überlebensfähig ist (Abb. 27). Des weiteren konnte gezeigt werden, dass bereits die genetische Kombination aus *npl3Δ gbp2Δ* bei 37°C nahezu letal ist (Abb. 27). Eine *GBP2* Überexpression führt in *npl3Δ* zu einem partiell verbesserten Wachstum, während eine Überexpression von *HRB1* keinen positiven Effekt zeigt (Abb. 28). Gbp2p verfügt möglicherweise über eine anteilig überschneidende Funktion mit Npl3p im mRNA Export oder in der Regulation verwandter Prozesse. Möglicherweise werden spezifische mRNA Pools von Npl3p und Gbp2p gleichermaßen gebunden.

Um Sicherzustellen, dass die nicht visualisierten mRNA Export-Defekte in *npl3Δ* nicht auf sekundäre Effekten beruhen, erfolgten ergänzende Analysen. Störungen in der Transkription, die aufgrund der durch die RNA-Polymerase II vermittelte Rekrutierung von Npl3p zur mRNA theoretisch denkbar wären, können zu einer verminderten oder gestörten mRNA Synthese führen. Auch können ko-transkriptionale prä mRNA Prozessierungsstörungen stattfinden, die rasche nukleäre prä mRNA Degradationen nach sich ziehen. Verminderte Syntheseraten oder rascher Abbau anteilig fehlprozessierter mRNAs werden in den mRNA Export Analysen der Cy3-markierten mRNA visuell nicht erfaßt (Abb. 11). In Northern „Dot Blot“ Experimenten konnte jedoch gezeigt werden, dass die Rate synthetisierter mRNA in *npl3Δ* im Vergleich zum WT nicht verringert ist (Abb. 12). Auch die mRNA Stabilitäten, die durch mRNA Prozessierungsdefekte negativ beeinflusst werden könnten, sind in Wildtyp und *npl3Δ* in etwa gleichwertig (Abb. 13).

Interessanterweise wurden jedoch signifikante Reduktionen in der Protein-Neusynthese identifiziert, die Ursache für den Wachstumsdefekt in *npl3Δ* sind (Thomas Gross und Heike Krebber). Npl3p ist als mRNA assoziierter Faktor bekannt, der mRNA Moleküle bis hin zur aktiven Translationsphase bindet und damit im Zytoplasma auch eine mRNA assoziierte Funktion z.B. in der Zusammenführung und Stabilisierung katalytisch aktiver Ribosomen übernehmen könnte. Möglich wäre zudem, dass Npl3p nicht nur eine Funktion als mRNA Export Adapter übernimmt, sondern auch als genereller Exportfaktor agiert, der den Transport präribosomaler Untereinheiten über rRNA und/oder Proteinbindung unterstützt. Daher wurde der nukleäre Export ribosomaler prä-60S und 40S Untereinheiten untersucht. Rpl25p-GFP, ein repräsentatives Protein der prä-60S Untereinheit und Rps2p-GFP der 40S Untereinheit wurden in der GFP-mikroskopischen Lokalisationsstudie als Reporterproteine analysiert. Tatsächlich führt eine Deletion von *NPL3* zu einer abnormen Akkumulation des die prä-60S Untereinheit repräsentierenden Rpl25p-GFP im Zellkern (Abb. 15). Der Export des Rps2p-GFP und damit der 40S Untereinheit wird hingegen in *npl3Δ* nicht gestört (Abb. 16). Mutationen von *NPL3* im S288C-Stammhintergrund zeigen ebenfalls Export-Defekte des prä-60S Reporterproteins Rpl25p-GFP im Zellkern (Thomas Gross und Heike Krebber). Diese unabhängig vom Stammhintergrund identifizierten nukleären prä-60S Export-Defekte verdeutlichen, dass Npl3p generell als neu identifizierter Faktor wichtig für

den Export dieser Makromoleküle ist. Seine Bedeutsamkeit im Transport der prä-60S Untereinheit kann in einer Export-Adapter oder Export-Rezeptor Funktion begründet liegen oder beruht auf einer Funktion in der ribosomalen prä-60S Biogenese, die ihrerseits Export-Defekte zur Folge haben kann.

4.1.1 Npl3p interagiert mit der prä-60S Untereinheit *in vivo*

Zunächst wurde untersucht, ob eine direkte Interaktion von Npl3p mit der großen ribosomalen Untereinheit besteht. Tatsächlich zeigt Npl3p eine sehr starke RNase A unabhängige Protein-Protein Wechselwirkung mit Rpl25p *in vivo*. Diese Interaktion konnte sowohl im essentiellen (S288C) als auch im nicht essentiellen (BY4741) Npl3p Stammhintergrund bestätigt werden und kennzeichnet damit die Generalität dieser direkten Interaktion (Abb. 17, A u. B).

Teil der Ribosomen-Biogenese ist die Prozessierung der rRNA Vorläuferstruktur 35S rRNA zu den final prozessierten 18S rRNA und 25S rRNA. Letztere ist Bestandteil der Export-kompetenten ribosomalen prä-60S Untereinheit. Um Hinweise auf rRNA Prozessierungsdefekte zu erhalten, wurden die prozessierten Endprodukte 25S und 18S rRNA analysiert. In Analysen zur rRNA Integrität wurden keine Veränderungen in der Synthese von 25S und 18S rRNA in *np13Δ* festgestellt. Beide vollständig prozessierten rRNA Typen konnten intakt visualisiert werden und entsprechen in ihren Konzentrationsverhältnissen von 2:1 den wildtypischen Gegebenheiten (Abb. 14, A und B). rRNA Synthese- oder Prozessierungsdefekte sind daher auszuschließen, die einen möglichen Einfluß auf den Export der ribosomalen prä-60S nehmen könnten. In RNA Ko-IP-Studien wurde ermittelt, dass Npl3p zu einem vergleichsweise dominanten Anteil 25S rRNA Moleküle bindet, die über RT-PCR Studien visualisiert wurden (Abb. 20). Npl3p interagiert aber auch mit der unprozessierten 35S rRNA, die nur im Nukleolus präsent ist (Abb. 20). Ein nur marginales Signal für die 18S rRNA als Npl3p interagierendes rRNA Element wurde ebenfalls analysiert (Abb. 20). Ebenso konnte ein nur sehr schwaches Interaktionssignal für das 40S Protein Rps2p in Npl3p Ko-IP Studien nachgewiesen werden, welche die fehlende Relevanz von Npl3p im Transport der ribosomalen 40S Untereinheit unterstreicht (Abb. 18). Die Fähigkeit von Npl3p 35S und 25S rRNA Strukturen stark zu binden, ist über die RRM-Domänen aber auch über drei vorhandene GAR-Motive innerhalb der SR-Domäne möglich (1.10; Burd & Dreyfuss, 1994; Birney *et al.*, 1993). Da Npl3p bereits die 35S rRNA Strukturen bindet, läßt dies den Schluß zu, dass eine Assemblierung von Npl3p mit den ribosomalen Vorläufern bereits sehr früh im Nukleolus erfolgt. Eine physikalische Interaktion von Npl3p mit dem nukleären Rix1p, welches die Spaltung des prä-90S Ribosoms nach entsprechender

rRNA Prozessierung unterstützt, konnte ebenfalls gezeigt werden (Thomas Gross und Heike Krebber). Nach dem Transport der prä-60S Untereinheit vom Nukleolus in das Zellkernplasma dissoziiert Rix1p vom Komplex (Bassler *et al.*, 2001; Galani *et al.*, 2004). Dieser Befund unterstützt eine frühe Rekrutierung von Npl3p zur ribosomalen Vorläuferstruktur. Eine Funktion von Npl3p in der nukleolaren Prozessierung des prä-90S Ribosoms ist allerdings auszuschließen. Zum einen konnten keine ribosomalen RNA Prozessierungsdefekte in *npl3Δ* festgestellt werden (Abb. 14) und zum anderen zeigen die Rpl25p-GFP Lokalisationsstudien in *npl3Δ* keine typischen GFP Signale, die sich auf eine Lokalisation im Nukleolus konzentrieren sowie sie z.B. für den nukleolaren rRNA Prozessierungsfaktor *nop2-4* bekannt sind (Hong *et al.*, 2001). Rpl25p-GFP ist in *npl3Δ* flächig über das gesamte Zellkernplasma verteilt (Abb. 15). Auffällig ist jedoch die Analogie zu der unlängst beschriebenen frühen ko-transkriptionalen Rekrutierung von Npl3p zur mRNA über die CTD der RNA Polymerase II (Conrad *et al.*, 2000). Möglicherweise könnte eine frühe Assoziation von Npl3p analog über die RNA Polymerase I zur 35S rRNA erfolgen. Noch während der Transkription assemblieren ribosomale Proteine der rRNA zur Formation des nukleolaren prä-90S Ribosoms. Zu diesen früh assemblierenden ribosomalen Proteinen gehört auch das Rpl25p mit dem Npl3p interagiert (el-Baradi *et al.*, 1985; Yeh & Lee, 1998).

4.1.2 Npl3p ist unabhängig von Mex67p-Mtr2p und Nmd3p-Xpo1p am Exportprozess der ribosomalen prä-60S-Untereinheit beteiligt

Weitere physikalische Interaktionsstudien zeigten, dass Npl3p mit Faktoren der Exportkompetenten prä-60S Untereinheit interagiert. So wurde eine RNase A insensitive Direktinteraktion von Npl3p mit Nmd3p identifiziert (Abb. 21). Nmd3p assoziiert erst zu einem späten Zeitpunkt mit der prä-60S Untereinheit, wenn diese weiteren zellkernplasmatischen rRNA Prozessierungs-Schritten und Konformationsänderungen unterzogen wurde. Die Assoziation von Nmd3p markiert den Export-kompetenten Zustand der ribosomalen prä-60S Untereinheit und katalysiert mit seiner Assoziation als Export-Adapter, der ein NES Signal für die Rekrutierung des Export Rezeptors Xpo1p trägt, den Export der prä-60S Untereinheit. Eine *nmd3-2*-Mutante führt entsprechend zu nukleären Export-Defekten von Rpl25p-GFP (Gadal *et al.*, 2001). Eine Deletion von *NPL3* wirkt sich nicht negativ auf die Bindung von Nmd3p mit der prä-60S Untereinheit aus (Abb. 22). Dieses Ergebnis zeigt an, dass im Zellkernplasma erfolgende Reifungsprozesse der prä-60S Untereinheit durch eine *NPL3* Deletion nicht beeinträchtigt werden und daher die Nmd3p Assoziation zur Export kompetenten prä-60S Untereinheit in *npl3Δ* stattfinden kann, aber auch, dass Nmd3p nicht über Npl3p an die prä-60S-Untereinheit bindet. Der Transport dieser makromolekularen prä-

60S Untereinheiten durch die Kernporen-Komplexe benötigt nicht nur einen Export-Adapter bzw. Export-Rezeptor. Neben Nmd3p-Xpo1p spielt wie erst kürzlich bekannt geworden auch Mex67p-Mtr2p als Exportfaktor der prä-60S Untereinheit eine wichtige Rolle (Yao *et al.*, 2007). Tatsächlich wurde für Mex67p eine Interaktion mit den rRNA Strukturen der prä-60S vorgeschlagen (Yao *et al.*, 2007; Yao *et al.*, 2008). Damit ist eine typische Adapter-Rezeptor Interaktion zwischen Npl3p und Mex67p nicht nur im Kontext des mRNA Transports möglich (1.7.5; Abb. 23 und Abb. 26). In Ko-IP Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass Mex67p mit der prä-60S Komponente Rpl25p direkt interagieren kann und dass diese Interaktion auch in *npl3Δ* nicht beeinträchtigt wird (Thomas Gross und Heike Krebber). Somit erscheint im Transport der prä-60S Untereinheit Npl3p als relevanter Adapter für Mex67p nicht notwendig zu sein. Demnach ist Npl3p neben Mex67p-Mtr2p und Nmd3p-Xpo1p vielmehr ein neuer unabhängiger Exportfaktor für die prä-60S Untereinheit (Ho *et al.*, 2000; Gadal *et al.*, 2001b; Kutay & Guttinger, 2005; Hedges *et al.*, 2006; West *et al.*, 2007; Bassler *et al.*, 2001; Nissan *et al.*, 2002; Yao *et al.*, 2007). Des weiteren ist bekannt, dass Npl3p mit dem Kernporen-Komplex assoziierten Mlp1p interagiert, welches wiederum in Kontakt steht mit dem Nukleoporin Nup60p (Abb. 24; Fasken *et al.*, 2008). Für dieses Kernporen-Komplex assoziierte Protein wurde nach „high-throughput“ Analysen auch eine Ko-Assoziation mit ribosomalen Strukturen gefunden (Fleischer *et al.*, 2006), die während des Translokationsprozesses entstehen können. Npl3p könnte daher auch unabhängig von löslichen Transport Rezeptoren selbsttätig mit den Kernporen-Komplexen interagieren und neben Mex67p-Mtr2p und Nmd3p-Xpo1p den Export der prä-60S Untereinheit unterstützen (Abb. 66).

Eine weitere interessante Beobachtung ist, dass in Gegenwart von bereits niedrigen Cycloheximid Konzentrationen (0,04 µg/ml) *npl3Δ*-Zellen nicht mehr überlebensfähig sind, während die klassischen Export-Faktoren der prä-60S Untereinheit mit ihren Mutanten *mtr2-33*, *nmd3-2* und *arx1Δ* nur geringe oder keine Wachstumsdefekte aufweisen. Mutanten des mRNA Exports wie *rat7-1* oder *mtr2-21* zeigen keinerlei synthetischen Wachstumsdefekte in Anwesenheit des Translationsinhibitors, wohl aber die „subunit-joining“-Mutanten *rpl10-G161D* und *fun12Δ* (Abb. 25). Die starken, mit dem „subunit joining“ Faktor *fun12Δ* vergleichbaren Wachstumsdefekte von *npl3Δ* deuten auf eine mögliche weitreichendere Funktion von Npl3p in der Translation im Zytoplasma hin. Vorstellbar wäre, dass Npl3p durch seine parallele Transportfunktion von prä-60S Untereinheit und der mRNA, die im Zytoplasma mit der 40S Untereinheit assoziiert, die Zusammenführung der Untereinheiten im „subunit joining“ Prozess unterstützt.

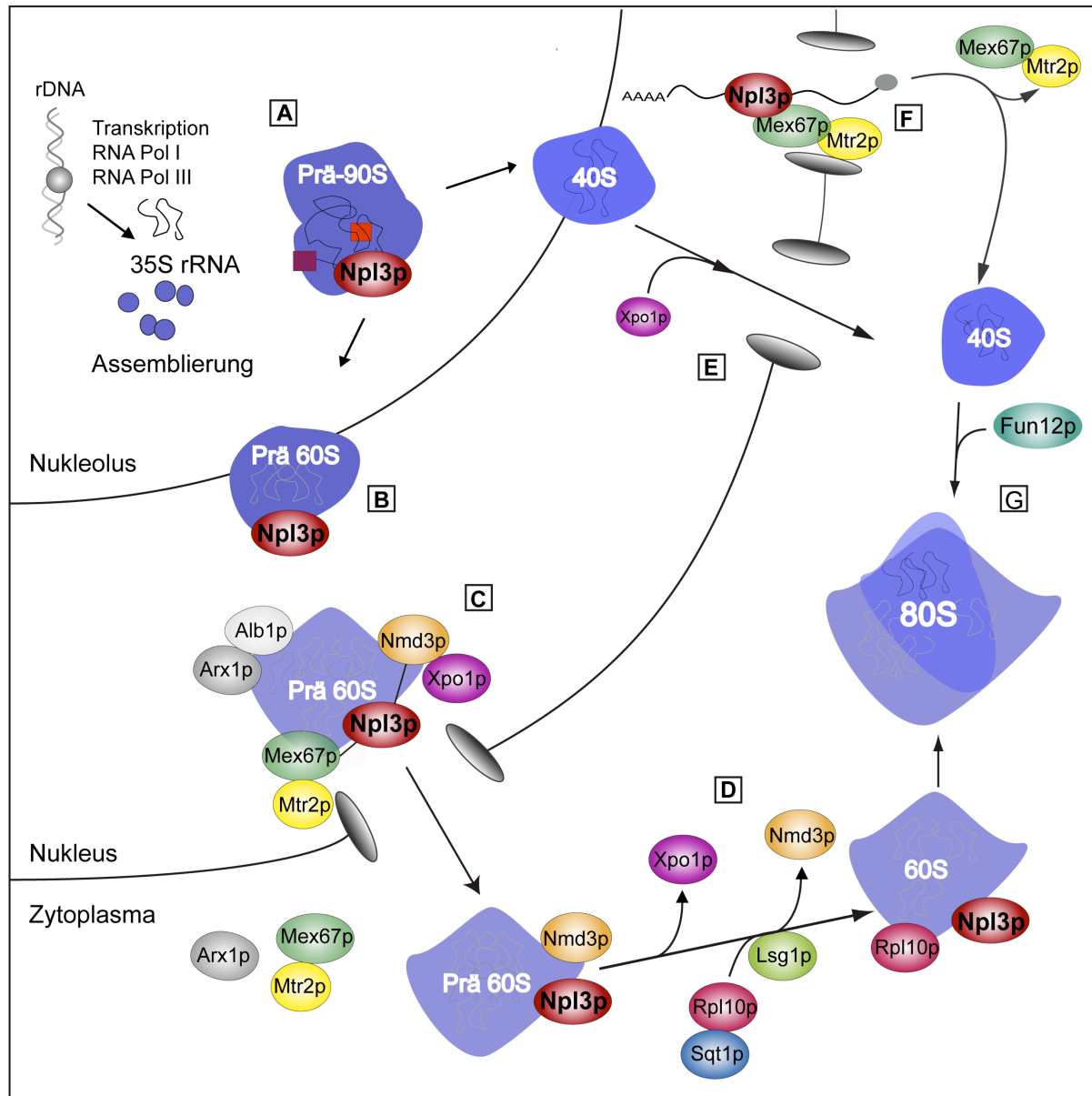


Abb. 66: Npl3p ist ein neu identifizierter Exportfaktor für den nukleären Export der prä-60S Untereinheit. A) Die Interaktion von Npl3p beginnt in der Frühphase der Ribosomen-Biogenese im Nukleolus. B) Npl3p interagiert darüberhinaus mit dem ribosomalen Protein Rpl25p und bindet spezifisch die prozessierte 25S rRNA im Nukleus/Zellkern. C) Weitere Export-Faktoren wie Arx1p, Alb1p, Nmd3p, Xpo1p und Mex67p-Mtr2p assoziieren mit dem Export-kompetenten prä-60S Partikel. Npl3p interagiert mit Mex67p und Nmd3p, fungiert aber nicht als Adpater für die Rekrutierung dieser Faktoren zur prä-60S Untereinheit. Npl3p vermittelt als unabhängiger Exportfaktor neben Arx1p, das Heterodimer Mex67p-Mtr2p und Nmd3p-Xpo1p den Export der prä-60S Untereinheit in das Zytoplasma. D) Mex67p-Mtr2p, Arx1p und Xpo1p dissoziieren nach dem Translokationsprozess von der prä-60S Untereinheit, während Rpl10p mit Hilfe seines Chaperons Sqt1p und der GTPase Aktivität von Lsg1p mit der prä-60S Untereinheit assoziiert. Gleichzeitig verläßt Nmd3p den prä-60S Komplex. E) Die 40S Untereinheit wird nicht von Npl3p in das Zytoplasma transportiert. Einzig bekannter Exportfaktor für die 40S Untereinheit ist Xpo1p. F) Npl3p assoziiert als bekanntes mRNA Bindeprotein auch mit der mRNA und interagiert mit dem Export-Rezeptor Mex67p. G) Die zytoplasmatische Zusammenführung von mRNA, 40S und 60S Untereinheit zur Bildung des katalytisch aktiven Ribosoms im „subunit joining“ Prozess wird von der GTPase Fun12p unterstützt.

4.2 Vergleichende Analysen der nukleär/zytoplasmatischen Exporteigenschaften von Npl3p, Gbp2p und Hrb1p

Nach bisherigem Model verlassen die SR-ähnlichen mRNA Bindeproteine Npl3p, Gbp2p und Hrb1p mRNA assoziiert den Zellkern über die Kernporen-Komplexe in das Zytoplasma. Dort dissoziieren die SR-ähnlichen Proteine von der mRNA und werden durch ihren spezifischen Importrezeptor Mtr10p für eine neue Runde des mRNA Exports zurück in den Zellkern transportiert (Windgassen & Krebber, 2003; Häcker & Krebber, 2003, Windgassen *et al.*, 2004). Über die spezifischen Funktionen im nukleären mRNA Export-Prozess ist vor allem für Gbp2p und Hrb1p nur wenig bekannt. In dieser Arbeit erfolgte daher eine vergleichende Charakterisierung der Exporteigenschaften von Npl3p, Gbp2p und Hrb1p. Für Gbp2p und Hrb1p wurde im Verlauf dieser Studien erstmalig eine Verbindung zum Spleißing-Prozess identifiziert.

4.2.1 Gbp2p und Hrb1p unterstützen als neu identifizierte Export-Adapter den mRNA Export-Prozess

Der bislang einzig bekannte Export-Rezeptor, der den Kontakt herstellt zu dem Export kompetenten mRNP Komplex und den Nukleoporinen der Kernporen-Komplexe ist das Heterodimer Mex67p-Mtr2p (TAP-p15 in höheren Eukaryonten). Mtr2p ist die Rezeptorkomponente, die über die strukturelle Fähigkeit verfügt direkt mit den FG-reichen Domänen der Nukleoporine zu interagieren, während Mex67p die Export-kompetente mRNA über die Interaktion mit spezifischen mRNA Bindeproteinen erkennt, die somit als Adapter fungieren (Stutz & Izaurralde, 2003). Bisher identifizierte Adapter, die mit Mex67p und der mRNA interagieren, ist zum einen die zellkernplasmatische TREX-1-Komplex Komponente Yra1p und das pendelnde SR-ähnliche mRNA Bindeprotein Npl3p (1.7.5; Gilbert & Guthrie, 2004). Eine Funktion als Export-Adapter war für Npl3p nach *in vitro* Experimenten bekannt (Gilbert & Guthrie, 2004) und ist in dieser Arbeit auch *in vivo* bestätigt worden (Abb. 23 und 26, A). Ebenfalls sind Gbp2p und Hrb1p als Export-Adapter für den Export-Rezeptor Mex67p neu identifiziert worden (Abb. 26, B und C). Analog rekrutieren auch die mRNA bindenden SR-Proteine der höheren Eukaryonten ASF/SF2, 9G8 und SRp20 den homologen mRNA Export-Rezeptor TAP (Hargous *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2004; Tenenbaum & Aguirre-Ghiso, 2005). In Übereinstimmung mit den neu identifizierten Adapter-Rezeptor-Wechselwirkungen zeigen frühere Ergebnisse der Arbeitsgruppe, dass der nukleäre Export von Npl3p, Gbp2p und Hrb1p durch eine *mex67-5* Mutante vollständig blockiert wird (Häcker & Krebber, 2004). Diese Daten unterstützen die These, dass SR-ähnliche Proteine

ausschließlich über den Mex67p-Mtr2p Rezeptor vermittelten mRNA Transportweg durch die Kernporen-Komplexe in das Zytoplasma gelangen. Es bleibt zu klären, ob Npl3p, Gbp2p und Hrb1p redundant dieselben mRNAs binden und in das Zytoplasma transportieren oder ob möglicherweise eine Differenzierung in ihrer Bindung von unterschiedlichen mRNA Klassen besteht und auf diese Weise verschiedene mRNA Transportwege entstehen könnten. Da nach Microarray Analysen nur rund 20% der transkribierten mRNAs von Mex67p gebunden werden (Hieronymus & Silver, 2001) bleibt ein weites Feld offen für die Bindung und den Transport von mRNAs durch noch andere unbekannte mRNA Rezeptoren und mRNA Adaptoren.

4.2.2 Der Export-„Screen“: Identifizierung neuer Export relevanter Faktoren für Gbp2p, Hrb1p und Npl3p

In einem Export „Screen“, der mit Hilfe einer zytoplasmatischen Version des Gbp2p, gbp2_cp-GFP, durchgeführt wurde, erfolgte ein „Screening“ nach Faktoren, deren Mutation zu einem Export-Defekt und damit zu einer Akkumulation von gbp2_cp-GFP im Zellkern führen (Abb. 29 und 30). In diesem „Screen“ wurden zwei Mutanten des Spt15p identifiziert (Tab. 5). Spt15p ist ein TATA Bindeprotein und ein genereller Transkriptionsfaktor für die RNA Polymerasen I, II und III, der zusammen mit anderen Faktoren den transkriptionalen Präinitiationskomplex an den Promoterbereichen bildet (Cormack & Struhl, 1992; Yamaguchi *et al.*, 2001). Mutationen in Transkriptionsfaktoren führen zu verminderten mRNA Synthesen. Auch die zytoplasmatischen Versionen GFP-npl3_cp und Hrb1_cp-GFP zeigen wie auch gbp2_cp-GFP eine nukleäre Anreicherung in diesen Mutanten (Abb. 32), da sie nur in Assoziation mit der synthetisierten mRNA den Zellkern verlassen.

4.2.3 Im Export Screen identifizierte Spleißingfaktoren bewirken Export-Defekte für Gbp2p und Hrb1p

Interessanterweise konnten in diesem „Screen“ auch die mutierten Spleißingfaktoren, *prp8-908/988* und *prp17-Q336** identifiziert werden, die zu Akkumulationen von gbp2_cp-GFP im Zellkern führen (Abb. 32). Auch Hrb1_cp-GFP zeigt nukleäre Export-Defekte in diesen Mutanten, während GFP-npl3_cp in seiner zytoplasmatischen Verteilung unbeeinflusst bleibt. Die identifizierte *prp17-Q336** Mutante weist ein frühzeitiges Stop-Kodon im C-Terminus auf,

was zu einer C-terminalen Verkürzung um 119 Aminosäuren führt. Im C-Terminus befinden sich fünf G β -Motive, die durch interne WD (Tryptophan-Aspartat) Dipeptid Wiederholungen strukturell häufig eine Plattform zur Bindung von Proteinkomplexen darstellen. Durch das vorzeitige Stop-Kodon in der *prp17-Q336** Mutante fehlen die letzten zwei G β -Motive und könnten damit möglicherweise Protein-Protein Wechselwirkungen beeinträchtigen (Abb. 33). Zusammen mit Slu7p, Prp18p, Prp16p und Prp22p bildet Prp17p die Gruppe derjenigen Faktoren, die ausschließlich im zweiten Spleißing Schritt involviert sind (Umen & Guthrie, 1995). Prp17p trägt im Spleißing Schritt II zur Erkennung der 3' AG-Spleißstelle bei und beeinflusst positiv die Effizienz der zweiten Transesterifizierungsreaktion. Die Deletion dieses Spleißingfaktor zeigt seinen essentiellen Charakter erst bei einer erhöhten Temperatur von $\geq 35^{\circ}\text{C}$. Die im „Screen“ identifizierte Mutante des Prp8p (Melanie Janning und Heike Krebber) ist eine spleißosomale Kern-Komponente, die im zweiten katalytischen Spleißing-Schritt II involviert ist, aber auch an zahlreichen spleißosomalen Umstrukturierungsprozessen beteiligt ist, die gleichermaßen die Erkennung von 5'- und 3'-Spleißstellen unterstützen. Diese im „Screen“ identifizierte Spleißingfaktor-Mutante *prp8-908/988* weist zwei nahe beieinander liegende Punktmutationen auf. Beide Punktmutationen führen zu einem Aminosäureaustausch an Position 908 von Aspartat zu Tyrosin (D908 \rightarrow Y) und an Position 988 von Glutamat zu Lysin (E988 \rightarrow K). Die Mutationen befinden sich in einem hoch konservierten Sequenzbereich vor einem RNA Erkennungsmotiv (RRM) und befinden sich darüberhinaus innerhalb einer Region, die für die intramolekulare Wechselwirkung des Proteins mit sich selbst von Bedeutung ist (Abb. 33). Möglicherweise beeinflussen die Mutationen die für dieses Protein beschriebenen notwendigen Basenpaarungen mit der 5'- oder 3'-Spleißstelle oder Verzweigungsstelle. Möglich ist auch, dass die *prp8-908/988* Mutationen einen Einfluß auf die spleißosomalen Umstrukturierungsprozesse, die eine katalytisch aktive Konformation favorisieren, beeinträchtigen. In dieser Sequenzregion existieren weitere bekannte Mutanten (P986T, Y923C und E942G) (Grainger & Beggs, 2005; Konforti & Konarska, 1994; Frank *et al.*, 1992). Diese können interessanterweise andere Mutanten des zweiten Spleißing-Schrittes supprimieren (Grainger & Beggs, 2005; Konforti & Konarska, 1994; Frank *et al.*, 1992) und zeigen damit ihre funktionelle Verbindung zum zweiten Spleißing-Schritt. In ähnlicher Weise ist die *prp8-101* Mutante, die eine Blockierung der 3' Spleißstellen Erkennung bewirkt synthetisch letal mit Mutanten von *PRP17*, *SLU7*, *PRP16* und *PRP18*. Im Gegensatz dazu blockiert die Mutante *prp8-1* den initialen Spleißvorgang vor dem ersten katalytischen Spleiß-Schritt. Diese Mutante zeigt entsprechend keine genetischen Interaktionen mit den vier genannten mutierten Spleißing-Faktoren, die ausschließlich im zweiten Spleißing Schritt funktionell sind (Umen & Guthrie, 1995).

Analog zu diesen Experimenten wurde gezeigt, dass die im Screen identifizierte Mutante *prp8-908/988* bei 30°C einen synthetisch letal Effekt in der genetischen Kombination mit der *prp17Δ* Nullmutante zeigt (Abb. 35). Somit wird deutlich, dass auch die *prp8-908/988* Mutante ebenso wie *prp17-Q336** oder *prp17Δ* einen negativen Effekt auf den zweiten Spleißing Schritt ausübt.

Um weitere Faktoren zu identifizieren, die in dem zweiten Spleißing Schritt involviert sind und potentielle Export-Defekte der SR-ähnlichen Proteine auslösen, wurde die Mutante *slu7-E215A-I216A-E217A* (*slu7-EIE*) auf SR-Protein Export-Defekte hin untersucht. Tatsächlich sind ähnliche Mislokalisationen von gbp2_cp-GFP und Hrb1_cp-GFP im Zellkern vorhanden. GFP-npl3_cp zeigt hingegen wie auch in den anderen beiden Spleißingfaktor Mutanten keine Export-Defekte (Abb. 34). Diese Daten zeigen deutlich, dass Störungen in der 3'-AG Spleißstellen Erkennung und zweiten katalytischen Spleißreaktion einen starken Einfluß auf den mRNA assoziierten Export von Gbp2p und Hrb1p im Gegensatz zu Npl3p haben. Des weiteren wurde auch eine Mutante des Spleißingfaktors Prp43p auf SR-Protein Export-Defekte hin untersucht. Prp43p hat keine Funktion im zweiten Spleißing Schritt, sondern katalysiert zeitlich später im postspleißosomalen Komplex die Intron-Lariat Freisetzung und initiiert in einem ATP abhängigen Schritt die Dissoziation der U snRNPs. Auch in der Prp43p Mutante, *prp43-S247A*, sind starke Mislokalisationen von gbp2_cp-GFP und Hrb1_cp-GFP visualisierbar, während GFP-npl3_cp in seiner zellulären Verteilung weitestgehend unbeeinflusst bleibt (Abb. 34). Nach diesen experimentellen Ergebnissen kann festgehalten werden, dass der nukleäre Export von Gbp2p und Hrb1p nicht nur durch Störungen im zweiten Spleißing Schritt, sondern auch in der späteren spleißosomalen Abfolge der Intron-Freisetzung und Disassemblierung erheblich gestört wird. Im nächsten Schritt wurden potentielle physikalische und genetische Interaktionen der SR-Proteine mit den Spleißingfaktoren analysiert.

4.2.4 Gbp2 und Hrb1p interagieren genetisch und physikalisch mit Spleißing-Faktoren

In dieser Arbeit wurden für Gbp2p starke RNase A insensitive Protein-Protein-Wechselwirkungen mit den Spleißingfaktoren Prp17p und Prp43p identifiziert (Abb. 37 und Abb. 39). Auch Hrb1p zeigt physikalische Interaktionen. Im Gegensatz dazu interagiert Npl3p nicht mit diesen Spleißingfaktoren. (Abb. 37 und Abb. 39). Eine nicht vorhandene physikalische Interaktion zwischen Npl3p und Prp43p wurde auch in der Publikation Kress *et al.*, 2008 gezeigt.

Interessanterweise führt die *prp8-908/988* Mutation zu einer völligen Unterbindung der physikalischen Interaktion zwischen Gbp2p und dem Spleißingfaktor Prp17p (Abb. 38, A). Im Falle von Hrb1p wird diese physikalische Interaktion stark geschwächt (Abb. 38, B). Bekannterweise stellt das 280 kDa große Prp8p Protein eine Kern-Komponente des Spleißosoms dar, das an vielen Konformationsumstrukturierungen im Spleißosom beteiligt ist und daher auch die Interaktion zwischen den SR-ähnlichen Proteinen und den Spleißingfaktoren der Spätphase beeinflussen kann. Prp8p katalysiert den Konformationswechsel, der beim Übergang von der ersten zur zweiten Transesterifizierungsreaktion notwendig ist (Zwei-Phasen Modell, Query & Konarska, 2004; 1.7.3.2). Möglicherweise kann die Bindung von Gbp2p und Hrb1p mit den Spleißingfaktoren nicht mehr erfolgen, da die für den zweiten Spleißing Schritt erforderliche Konformation in *prp8-908/988* nicht eingenommen werden kann.

Analog zu den gezeigten physikalischen Interaktionen sind gleichwertig starke genetische Interaktionen von *gbp2Δ* und *hrb1Δ* mit den Spleißingfaktor Mutanten *prp8-908/988*, *prp17Δ* und *prp43-S247A* bei 25°C nachgewiesen worden (Abb. 36, C und D). Eine *npl3Δ* Deletion weist keine additiven Wachstumsdefekte in seiner Kombination mit den analysierten Spleißingfaktor Mutanten bei 25°C auf und bestätigt damit auch auf genetischer Ebene erneut die nicht vorhandene Verbindung von Npl3p mit den Spleißingfaktoren der Spleißing-Spätphase (Abb. 36, B). Während die Doppel-Deletion aus *gbp2Δ hrb1Δ* keinen Wachstumsdefekt zeigt, sind die genetischen Tripel-Kombinationen aus *gbp2pΔ hrb1Δ* mit *prp8-908/988*, *prp17Δ* oder *prp43-247A* letal (Abb. 36, E). Diese starken Effekte deuten auf eine starke, sich ergänzende Funktion der zu 47% homologen SR-Proteine Gbp2p und Hrb1p in Verbindung mit Störungen der späten Spleißing-Phase hin. Des weiteren interagieren Gbp2p und Hrb1p bekannterweise auch mit den Komponenten des an der Transkriptionselongation und dem mRNA-Export beteiligten THO/TREX-1-Komplexes (Hurt *et al.*, 2004). Ebenso führen Deletionen von Faktoren des THO-Komplexes zu mRNA Export-Defekten der zytoplasmatischen Versionen von Gbp2p und Hrb1p, während Npl3p auch in diesen Mutanten keinen Export-Defekt anzeigt (Häcker & Krebber, 2004). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde bislang vermutet, dass Gbp2p und Hrb1p im Verlauf der Transkriptionselongation über den THO-Komplex auf die aktiv transkribierten mRNAs transferiert werden (Häcker & Krebber, 2004; Hurt *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu wird Npl3p von der RNA Polymerase II während der Transkriptionsinitiation auf die mRNA geladen (Lei *et al.*, 2001; Häcker & Krebber, 2004; Hurt *et al.*, 2004). Die für Gbp2p und Hrb1p identifizierten Export-Defekte sowohl in THO-Komplex- als auch in Spleißing-Mutanten und die identifizierten Interaktionen von Gbp2p und Hrb1p mit Faktoren beider Komplexe sprechen für eine funktionelle Verknüpfung von THO- und Spleißing-Komplex. Viele Studien in höheren Eukaryonten haben bereits gezeigt, dass Transkription und

Spleißing sich gegenseitig beeinflussen und regulatorisch im ko-transkriptionalen Spleißing-Prozess zusammenarbeiten (Reed, 2003; Kadener *et al.*, 2002; Neugebauer, 2002; Ostheim *et al.*, 1985; Beyer & Ostheim, 1988; Auboeuf *et al.*, 2002).

4.2.5 Die Rekrutierung von Gbp2p und Hrb1p zur mRNA ist Spleißing-abhängig

In RNA Ko-IP Studien wurde analysiert, ob Gbp2p, Hrb1p und Npl3p in ihrer mRNA Bindung durch Spleißingfaktor Mutationen gestört werden und somit einen nachfolgenden nukleären Export Block dieser Proteine erklären könnte. Interessanterweise erfolgte eine massive Reduktion der mRNA Bindungen für Gbp2p in allen drei Spleißingfaktor Mutanten um etwa 80%-90% (Abb. 50, 51, 52). Hrb1p zeigt in *prp8-908/988* eine um ca. 40% verringerte mRNA Bindung (Abb. 50). In *prp17Δ* und *prp43-S247A* nehmen die Reduktionen der mRNA Bindungen für Hrb1p ebenfalls um fast 80% ab (Abb. 51 und 52). Npl3p zeigt hingegen nur leichte Reduktionen der mRNA Bindungen um ca. 5%-20% (Abb. 50, 51, 52). Demnach ist eine Vervollständigung des Spleißingvorgangs notwendig für eine Rekrutierung von Gbp2p und Hrb1p zur mRNA, die über die Direktinteraktionen mit den Spleißingfaktoren Prp17p und Prp43p vermittelt werden könnten. Im Gegensatz dazu wird Npl3p auf alle mRNAs schon während der Transkriptionsinitiation geladen und erfährt daher keine signifikante Beeinflussung in seiner mRNA Bindung durch Spleißingfaktor-Mutationen.

In RNA Ko-IP Studien konnten aber auch verminderte mRNA Bindungen für die THO-Komplex Komponenten (Mft1p und Tho2p) in den Spleißingfaktor Mutanten *prp8-908/988*, *prp17Δ* und *prp43-S247A* gefunden werden (Abb. 54 und 55). Die Schwächung ihrer Bindungen beträgt 35%-40% bzw. 20%-30%. Analog zeigt auch die TREX-2-Komplex Komponente Thp1p vergleichbare Reduktionen der mRNA Bindungen um 27%-33%. Sowohl der THO-Komplex als auch der TREX-2 Komplex spielen eine Rolle in der Transkription und unterstützen bekannterweise die Verknüpfung von Transkription und mRNA Export (1.7.5; Jensen *et al.*, 2001; Strässer & Hurt, 2001; Fischer *et al.*, 2002; Fisher *et al.*, 2004; Gallardo *et al.*, 2003; Rodriguez-Navarro *et al.*, 2004; Gonzales-Aguilera, 2008). Außerdem interagiert der THO-Komplex sowohl mit der mRNA als auch mit dem Chromatin und verhindert die Ausbildung von DNA-RNA Hybridstrukturen. Der THO-Komplex rekrutiert Sub2p und Yra1p, die zusammen den TREX-1-Komplex bilden und der die weitere Reifung zum Export kompetenten mRNP-Komplex fördert (Jensen *et al.*, 2001; Strässer & Hurt, 2001; Jimeno & Aguilera, 2010). Der TREX-2-Komplex interagiert mit dem SAGA-Komplex für eine präzise Chromatin Positionierung und erleichtert sowohl die Transkriptionsaktivierung als auch die Transkriptionselongation. Darüberhinaus vermitteln die TREX-2-Komplex Komponenten Thp1p, Sus1p und Sac3p eine Positionierung der mRNA in die Peripherie der Kernporen-

Komplexe, die den mRNA Export effektiviert (Chekanova *et al.* 2008; Dieppois & Stutz, 2010). *THP1* zeigt darüberhinaus eine Verbindung zum TREX-1-Komplex und dem mRNA Export über seine synthetisch letal Interaktionen mit *YRA1* und *MEX67* (Fischer *et al.*, 2002). Die RNA-Ko-IP Ergebnisse bestätigen in jedem Fall die vorhandene Wechselwirkung von THO-Komplex und TREX-2-Komplex mit der Spleißing-Maschinerie, die auf die regulatorische Verknüpfung von Transkription, Spleißing und mRNA Export in *S. cerevisiae* hinweist. Möglicherweise wird die THO- und TREX-2-Komplex Rekrutierung zur mRNA durch Spleißingfaktor-Mutationen aufgrund eines ko-transkriptionalen Spleißingprozesses partiell gestört. Bei den ermittelten Abnahmen der mRNA Bindungen um ein Viertel bis ein Drittel könnte es sich aber auch um den Anteil Intron-haltiger Transkripte handeln, die ca. 25%-30% des Gesamttranskriptanteils in der Zelle ausmachen (Ares *et al.*, 1999, Lopez & Seraphin, 1999). Für diesen Anteil könnte die Rekrutierung des THO-Komplexes und damit die Transkriptionselongation durch vorzeitige Spleißing-Störungen unterbunden werden. Auch ist nicht bekannt, ob in *S. cerevisiae* das Spleißosom soweit entwickelt ist, dass es zwischen Intron-haltiger und Intron-loser mRNA zu unterscheiden vermag oder ob es alle Transkripte kontaktiert und auf Intronsequenzen hin überprüft. Ein Beispiel, dass die zuletzt genannte Theorie unterstützen könnte, ist die RNA Helikase Sub2p (UAP56 in Vertebraten), die initial als Spleißingfaktor identifiziert wurde, jedoch über den THO-Komplex sowohl auf Intron-haltige als auch Intron-lose Gene transferiert wird (Zhang & Green, 2001; Jensen *et al.*, 2001). Ein „exon junction“ Komplex (EJC), der die Erkennung der Spleiß-Stellen unterstützt und eine Verbindung von Transkription, Spleißing und mRNA Export in höheren Eukaryonten herstellt, ist in Hefe nicht existent bzw. wurde bislang noch nicht identifiziert. In höheren Eukaryonten ist Aly/REF eine Komponente des EJC (Preker *et al.*, 2002). Das homologe Protein in *S. cerevisiae* ist Yra1p (Zenklusen *et al.*, 2001). Diese TREX-1-Komplex Komponente interagiert sowohl mit Gbp2p als auch mit Hrb1p, während für Npl3p keine Interaktion mit diesem Faktor gezeigt werden konnte (Hurt *et al.*, 2003). Möglicherweise übernehmen Gbp2p und Hrb1p im Verband mit Yra1p ebenfalls eine Funktion in der Verknüpfung von Transkription, Spleißing und mRNA Export.

Interessanterweise besteht auch eine genetische und physikalische, überwiegend RNase sensitive Interaktion von Spleißing-Faktoren der Spleißing-Frühphase mit Npl3p (Kress *et al.*, 2008). Diese Interaktionen von Npl3p mit U1 und U2 snRNP Spleißingfaktoren konnte für Gbp2p hingegen nicht gefunden werden (Kress *et al.*, 2008). Umgekehrt identifizieren die in dieser Arbeit präsentierten Daten eine ausschließliche Verbindung von Gbp2p und Hrb1p mit Spleißingfaktoren der Spleißing-Spätphase, die für Npl3p nicht besteht. Npl3p wurde somit als früh mRNA assemblierendes Bindeprotein vorgeschlagen, das Spleißing Faktoren der U1 und U2 snRNPs zur mRNA rekrutiert und so die initiale spleißosomale Assemblierung unterstützt (Kress *et al.*, 2008). Nach den in dieser Arbeit präsentierten Daten verstärken im

Gegensatz dazu die Spleißing-Faktoren der Spleißing-Spätphase die mRNA Bindungen von Gbp2p und Hrb1p.

4.2.6 Eine Überexpression von Gbp2p supprimiert den synthetisch Letaleffekt zwischen *sky1Δ* und *prp17Δ*

Eine weitere interessante genetische Interaktion besteht zwischen der zytoplasmatischen Kinase Sky1p und den nukleären Spleißingfaktoren Prp17p und Prp8p (Dagher & Fu, 2001). Es wurde eine synthetische Letalität zwischen *sky1Δ* und spezifischen *prp8* Mutanten gefunden, die Aminosäuren (AS)-Austausche in einer Region (1372-1660 AS) aufweisen, die für die exakte 3' AG Erkennung bedeutsam sind (Dagher & Fu, 2001; Grainger & Beggs, 2005). Ebenso beeinflusst *prp17Δ* konvergent diese Funktion im Spleißingprozess. Da ein direkter Kontakt zwischen den nukleären Spleißing-Faktoren und der zytoplasmatischen Kinase Sky1p aufgrund der unterschiedlichen Kompartiment Verteilung unwahrscheinlich ist, könnte dieser synthetische Effekt vielmehr von einem Sky1p Substrat vermittelt werden (Dagher & Fu, 2001; Abb. 67). Sky1p ist wie auch das homologe Protein in höheren Eukaryonten *SRPK1* die spezifische Kinase der SR-ähnlichen bzw. SR-Proteine. Andere Substrate, die von Sky1p phosphoryliert werden, sind bisher nicht bekannt. Sky1p unterstützt durch Phosphorylierungen den Mtr10p vermittelten Reimport der SR-ähnlichen Proteine Npl3p und Gbp2p in den Zellkern (Windgassen & Krebber, 2003; Windgassen *et al.*, 2004). Ob Hrb1p ebenfalls ein Substrat der Sky1p Kinase darstellt, ist bislang noch nicht eindeutig geklärt (Häcker & Krebber, 2003; Porat *et al.*, 2006). Aufgrund der Sequenzhomologien von Hrb1p und Gbp2p ist eine Sky1p vermittelte Phosphorylierung von SR-Dipeptiden in Hrb1p jedoch wahrscheinlich.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine durch Galaktose-Induktion vermittelte Überexpression von Gbp2p die synthetische Letalität zwischen *sky1Δ* und *prp17Δ* vollständig aufheben kann, während die Überexpressionen von Npl3p oder Hrb1p zu keinen Wachstumsverbesserungen führen (Abb. 42). In *skyΔ* Zellen werden Gbp2p und Npl3p bekannterweise in ihrer Dissoziation von der mRNA im Zytoplasma nicht beeinflusst (Windgassen *et al.*, 2004), aber Gbp2p ist das einzige SR-ähnliche Protein, das eine starke abnormale zytoplasmatische Anreicherung aufweist (Windgassen & Krebber, 2003; Abb. 41, A). Eine Sky1p vermittelte Phosphorylierung von Gbp2p verbessert demnach erheblich die Reimportrate durch den Importrezeptor Mtr10p. Ob eine Phosphorylierung des reimportierten Gbp2p auch im Zellkern eine mögliche Funktion z.B. in der mRNA Bindspezifität für Intronhaltige mRNA Klassen oder in der 3'-AG Erkennung spielt, bleibt zu klären. Ein adäquates Proteinniveau von Gbp2p im Zellkern ist für den Spleißing Ablauf und den Transport der

gespleißten mRNAs offenbar von essentieller Bedeutung, die über eine Gbp2p Überexpression in *sky1Δ prp17Δ* ausgeglichen werden kann (Abb. 41, B und 42). Möglicherweise koordiniert und/oder kontrolliert die mRNA Bindung von Gbp2p das ko-transkriptionale Spleißing, welche einen effektiven und selektiven Transport der gespleißten mRNAs unterstützt. In Übereinstimmung mit diesen Überlegungen konnten Reduktionen der Genexpression von Intron-haltigen Reporterkonstrukten im *gbp2Δ* beobachtet werden, die nahezu vergleichbar sind mit entsprechenden Expressionsreduktionen, die durch einen *sky1Δ* und dadurch bewirkten Mangel an Gbp2p Proteinen im Zellkern ausgelöst wurden (Abb. 44). Die Doppelkombination aus *sky1Δ* und *gbp2Δ* führt konsequenterweise zu keinen weiteren additiven Reduktionseffekten in der Expression des Intron-haltigen Gens (Abb. 44).

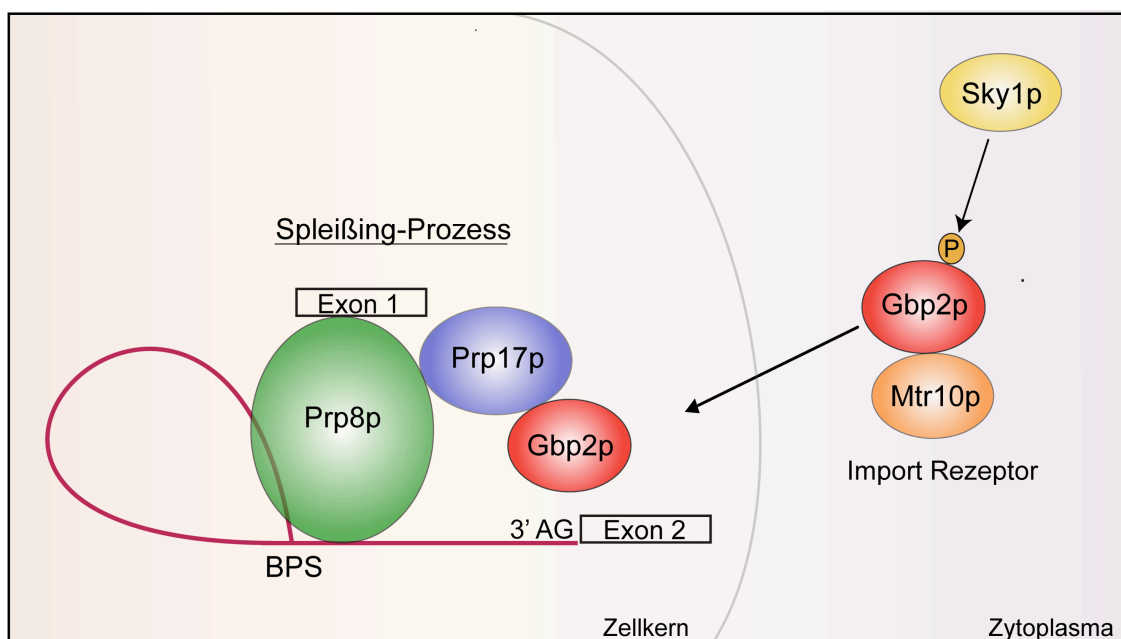


Abb. 67: Die genetische Letalität zwischen Prp17p und Sky1p wird durch eine Überexpression von Gbp2p aufgehoben. Sky1p mediatisiert die Phosphorylierung von Gbp2p im Zytoplasma und ermöglicht so den Mtr10p vermittelten Reimport. Gbp2p interagiert mit Prp17p und wird auf diese Weise in seiner mRNA Bindung während der 3' AG Spleißstellen Erkennung rekrutiert (Modell modifiziert und erweitert nach Dagher & Fu, 2001).

Analog ist in den höheren Eukaryonten bestätigt, dass eine SR-Protein Phosphorylierung im Zytoplasma durch die Kinasen *SRPK 1* und *SRPK 2* die Bindung des Importrezeptors Transportin-SR unterstützt und damit der Reimport der pendelnden SR-Proteine auf diese Weise gewährleistet wird (Lei *et al.*, 2001; Caceres *et al.*, 1997; Yeakley *et al.*, 1999). Beispielsweise bindet 9G8 im hyperphosphorylierten Zustand die mRNA und erfährt während des katalytischen Spleißingprozesses eine Dephosphorylierung *in vivo* und *in vitro*, während nach einer Dephosphorylierung die Bindeaffinität des hypophosphorylierten 9G8 und ASF/SF2 zum homologen Export Rezeptor TAP (Mex67p in Hefe) entscheidend erhöht wird (Huang *et al.*, 2004). Auf diese Weise wird gewährleistet, dass TAP präferentiell gespleißte

mRNA-Protein als ungespleißte mRNA-Protein Komplexe bindet (Xiao & Manley, 1997; Blaustein *et al.*, 2005; Sanford *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2004; Tenenbaum & Aguirre-Ghiso, 2005; Hargous *et al.*, 2006) (1.8). Eine regulatorische Dephosphorylierung des Sky1p Substrates Gbp2p wäre hinsichtlich der Rekrutierung des Export Rezeptors Mex67p für einen Transport gespleißter mRNA-Protein Komplexe analog ebenfalls vorstellbar.

4.2.7 Deletionen der SR-ähnlichen Proteine führen zu leichten Spleißing-Defekten

Ein direkter Einfluß von Npl3p, Gbp2p und Hrb1p auf das Intron Spleißen wurde in Northern Blot Experimenten mit Hilfe eines Intron-haltigen Reportergens überprüft. Überraschenderweise konnten in *npl3Δ*, *hrb1Δ* und *gbp2Δ* leichte Spleißing-Defekte verzeichnet werden, wobei in *gbp2Δ* die stärksten Defekte detektiert wurden (Abb. 43). Die Doppel-Deletion von *hrb1Δ gbp2Δ* führt zu keiner signifikanten Verstärkung der Spleißing Defekte (Abb. 43). Die beobachteten Anreicherungen der ungespleißten Transkripte in den Deletionen der SR-ähnlichen Proteine fallen jedoch deutlich schwächer aus als die beobachteten Spleißing-Defekte der Spleißingfaktor Mutanten *prp8-908/988* und *prp17Δ* (Abb. 43). Die SR-ähnlichen Proteine sind daher wahrscheinlich nicht als direkt agierende Spleißingfaktoren zu charakterisieren. Da Npl3p als Faktor beschrieben wurde, der die Rekrutierung der initialen Spleißingfaktoren zur mRNA unterstützt und auch mit diesen sowohl genetisch als auch RNase A sensitiv interagiert (Kress *et al.*, 2008), sind leichte Spleißing-Defekte in *npl3Δ* durch Verzögerungen in der spleißosomalen Assemblierung erklärbar. Die gegenüber einer *HRB1* Deletion leicht stärkeren Spleißing-Defekte in *gbp2Δ* könnten in einer stärkeren Verbindung von Gbp2p mit dem zweiten Spleißing-Schritt begründet liegen. So liegt im Vergleich zu Hrb1p eine stärkere Direktinteraktion von Gbp2p mit Prp17p vor (Abb. 37). Auch rettet im Gegensatz zu Hrb1p eine Gbp2p Überexpression den Letaleffekt der *prp17Δ sky1Δ* Doppel-Deletion.

Die Spleißing Defekte in *gbp2Δ* aber auch *hrb1Δ* könnten vielmehr für eine Spleißing und Export verknüpfenden Funktion dieser Faktoren sprechen und/oder sie beruhen auf einen Rückkopplungs-Mechanismus, der durch einen ineffektiven oder deregulierten mRNA Transport von gespleißten mRNAs ausgelöst werden könnte.

4.2.8 Deletionen von *GBP2* und *HRB1* führen zu starken Expressionsabnahmen Intron-haltiger Gene

Im Verhältnis zu den identifizierten Spleißing-Defekten in *hrb1Δ* (7,5%), *gbp2Δ* (17,5%) oder der Doppel-Deletion *gbp2Δ hrb1Δ* (18%) wurden auf Translationsebene deutlich stärkere Effekte für Störungen in der Expression Intron-haltiger Reportergene erzielt. Gbp2p ist in der Analyse der Proteinexpression von Intron-haltigen Genen das am stärksten reagierende SR-ähnliche Protein mit Abnahmen um 48% in beiden Fällen der untersuchten Reportergene (Abb. 44 und 48). In *hrb1Δ* wurden ebenfalls z.T. starke Reduktionen von 41% und 27% gemessen (Abb. 44 und 48). Besonders starke Effekte wurden in der Doppel-Deletion *gbp2Δ hrb1Δ* gefunden. In *gbp2Δ hrb1Δ* kommt es zu einer Abnahme der Proteinexpression Intron-haltiger Transkripte um 56% und 66%. Da im Gegensatz zu den Einzeldelationen auch die Doppel-Deletion *gbp2Δ hrb1Δ* in der genetischen Kombination mit Spleißingfaktor-Mutanten stärkere synthetische Effekte (synthetisch letal) erzielte, ist es wahrscheinlich, dass Gbp2p und Hrb1p in der Spleißing-abhängigen Proteinexpression sich funktionell ergänzen und daher zu einer Verstärkung der Defekte führen. Auch könnten beide Faktoren durch ihre Protein-Protein Interaktion als funktionelles Heterodimer agieren (Abb. 59). Die starken Expressionsabnahmen in *gbp2Δ hrb1Δ* sind vergleichbar mit den analysierten Expressionsabnahmen in *prp17Δ* (57% und 72%). Da die beobachteten Reduktionen in *gbp2Δ hrb1Δ* auf die eher weniger starken Spleißing-Defekte zurückzuführen sind, liegen die funktionellen Schwerpunkte dieser mRNA Bindeproteine vermutlich eher im Exportprozess von gespleißten mRNAs, die die Translation dieser mRNAs beeinflussen. Eine Funktion von Gbp2p und Hrb1p in der Translation ist weniger wahrscheinlich. Im Gegensatz zu *np13Δ* reagieren *gbp2Δ* und *hrb1Δ* nicht wachstumssensitiv auf den Translationsinhibitor Cycloheximid (Abb. 25). Lediglich die Doppelkombination aus *gbp2Δ hrb1Δ* zeigt in Gegenwart von Cycloheximid (0,06 µg/mL) leichte Wachstumsdefekte wie sie auch für die Spleißingfaktor Mutanten *prp8-908/988* und *prp17Δ* gleichermaßen beobachtet wurden (Abb. 25). Diese leichten Sensitivitäten sind möglicherweise Ausdruck der nicht mehr exprimierten Intron-haltigen Gene, zu denen mit ~ 72% überproportional die Gruppe der ribosomalen Protein Gene gehören (Ares et al., 1999). Das Fehlen dieser Proteinfaktoren beeinträchtigt die Biogenese der Ribosomen und damit die Translation. In *np13Δ* konnten ebenfalls Reduktionen von 28% in der Proteinexpression des Intron-haltigen GFP Reportergens gemessen werden, die jedoch wesentlich geringer sind als die Werten von *gbp2Δ*, *hrb1Δ*, *gbp2Δ hrb1Δ* und den Spleißingfaktor Mutanten (Abb. 44). Neben den bereits erklärten Gründen für leichte Spleißing-Defekte in *np13Δ*, die durch die fehlende Rekrutierungshilfe für frühe Spleißingfaktoren zur mRNA und damit assoziierten Spleißosom Assemblierungsdefekten entstehen könnten, gilt nach bisherigem Modell nach wie vor die

unterstützende Exportadapter Funktion von Npl3p im Transport von sowohl Intron-losten als auch Intron-haltigen mRNAs.

4.2.9 Gbp2 und Hrb1 binden präferentiell die Gruppe der gespleißten mRNAs

Da die SR-ähnlichen Proteine Gbp2p und Hrb1p Spleißing-abhängig zur mRNA rekrutiert werden und die Proteinexpression Intron-haltiger Transkripte in ihren Deletionen stark beeinträchtigt wird, besteht die Möglichkeit, dass Gbp2p und Hrb1p spezifisch die Klasse der gespleißten mRNAs bindet und effektiv exportiert. Um diese Hypothese zu analysieren, wurden die RNA Bindungsprofile für Gbp2p und Hrb1p in RNA Ko-IP gekoppelten Microarray Analysen analysiert (RIP-Chip). Für Gbp2p wurden in der Auswertung 19% der gebundenen Transkripte als Intron-haltige Gene identifiziert, die dominant zur Gruppe der ribosomalen Protein Gene gehören (Abb. 61). Speziell diese Genklasse gilt als hoch exprimiert. Rund ein Viertel der identifizierten angereicherten mRNAs sind uncharakterisiert und entziehen sich daher einer genaueren Intronsequenz Analyse. Nach entsprechender qRT-PCR Validierung wurden die sechs ausgewählten Intron-haltigen Gene (*RPS6A*, *RPS23A*, *RPL23A*, *RPL17B*, *RPL30A* und *MMS2*) analysiert und verifiziert (Abb. 64). Gegenüber der mitgeführten Lysat/„Input“-Kontrolle als quantitatives Maß der basalen Expression wurde eine fast 4-fache Anreicherung dieser an Gbp2p gebundenen mRNAs bestätigt (Abb. 64). Hingegen konnten für die ebenfalls nach Microarray Analyse identifizierten Intron-losten Gene *RPS12*, *SLK1* und *CBS1* keine Anreicherung in den qRT-PCR Studien bestätigt werden (Abb. 64). Durch diese Validierung erhärten sich die Hinweise für eine spezifische Bindung Intron-haltiger bzw. gespleißter mRNAs durch das mRNA Bindeprotein Gbp2p. Ein in biologischen Replika bestätigter Anteil von 19% an Intron-haltigen mRNAs, die von Gbp2p spezifisch gebunden werden, reflektiert eine nahezu vierfache Anreicherung gegenüber dem im Gesamtgenom vorkommenden Anteil Intron-haltiger Gene von max. 5% in *S. cerevisiae*. Auch Hrb1p bindet zu 12% Intron-haltige Transkripte (Abb. 62). In den qRT-PCR Analysen konnten die Intron-haltigen Gene in ihrer Anreicherung wie auch für Gbp2p bestätigt werden (Abb. 65). Für *Rpl30A* konnte eine nahezu 4-fache Amplifikat-Anreicherung im Hrb1p spezifischen RNA Eluat gemessen werden (Abb. 62). Für die ebenfalls identifizierten Gene *RPS6A* und *RPS23A* fallen die Anreicherungen mit 1,8- und 1,3-fach etwas geringer aus, bestätigen jedoch ebenfalls eine Anreicherung. Intron-lose Gene konnten jedoch in der qRT-PCR nicht validiert werden (Abb. 62). Möglicherweise resultieren die offensichtlich falsch Positiven Ergebnisse der Microarray Analysen in einer unspezifischen Hybridisierung, die in den statistischen Analysen nicht erfaßt wurden. Das Verfahren des „Nest-Generation sequencing“ könnte bezüglich unspezifischer Hybridisierungen Abhilfe schaffen. Daten von

Hurt *et al.* 2004 zeigten aber auch nach ähnlich durchgeführten RNA Ko-IP Studien für Gbp2p und Hrb1p und anschließender RT-PCR, dass sowohl Intron-lose Gene (*GAL1*, *PMA1*, *HYP2* und *RPS5*) als auch Intron-haltige Gene (*DPB2* und *ACT1*) gebunden werden. Diese Gene wurden stichprobenartig für die Amplifikation ausgewählt. Ein Model, das auch diese und die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse miteinander vereinbaren könnte, wäre, dass Gbp2p und Hrb1p über den THO-Komplex zunächst initial mit allen aktiv transkribierten mRNAs, wenn auch unspezifisch und/oder schwach gebunden in Kontakt kommen (Häcker & Krebber, 2004; Hurt *et al.*, 2004. Eine spezifische und stabilisierte Bindung von gespleißten mRNAs mit Gbp2p und Hrb1p findet erst in der direkten Interaktion mit dem Spleißing-Komplex der Spleißing Spätphase statt und fördert ihre spezifische Bindung von gespleißten mRNAs.

In der Analyse von Gbp2p und Hrb1p gebundenen Transkripten erfolgte nicht nur die Untersuchung nach Intron-haltigen Genen, sondern es erfolgte ebenso eine Zusammenfassung der gebundenen Transkripte zu funktionellen Gen-Gruppen (Abb. 61 und 62). Sowohl Gbp2p als auch Hrb1p binden zu großen Anteilen ribosomale Protein Gene, die sehr häufig Intron Sequenzen enthalten. Außerdem sind die Subgruppen der rRNA Prozessierungsfaktoren und Faktoren der präribosomalen Reifungs- und Exportprozesse gefunden worden. Gbp2p und Hrb1p binden z.T. gleiche mRNAs. Eine Überschneidung der von beiden Proteinen spezifisch gebundenen Transkripte besteht jedoch nur zu 19%, wobei diese Übereinstimmungen zu 12% den Subgruppen der ribosomalen Protein Gene und rRNA Prozessierungsfaktoren zuzuordnen sind. Die in dem ersten Abschnitt dieser Arbeit identifizierten nukleolaren Akkumulationen von Rpl25p-GFP in *gbp2Δ* und *hrb1Δ* können sekundär auch auf Störungen eines mangelhaften mRNA Transports von nukleolaren rRNA Prozessierungsfaktoren zurückzuführen sein (Abb. 15). Ein mangelnder Export dieser mRNAs in das Zytoplasma verringert die Proteinexpression dieser rRNA Prozessierungsfaktoren, welche wiederum die Reifung des prä-90S Ribosoms im Nukleolus beeinträchtigt. Diese Prozessierungsdefekte stören den nachfolgenden Transport der gereiften prä-60S Untereinheiten in das Zellkernplasma und Zytoplasma. Gbp2p als auch Hrb1p binden nach Microarray Analyse die nukleolaren rRNA Prozessierungsfaktoren *BRX1*, *NOG2*, *TMA20*, *RPL30*, *NOP4*, *SSF1*, *CGR1* und *NOP7* (Abb. 61 und 62). In bereits durchgeführten Npl3p-RNA Ko-IP Studien konnte die Identifizierung einer Präferenz für spezifische mRNA Subklassen, die von Npl3p gebunden werden, nicht bestätigt werden (Kim-Guisbert *et al.*, 2005). Diese publizierten Daten liefern nach der in dieser Arbeit verwendeten statistischen Analyse in den ersten Top 100 der Rangliste einen Prozentsatz von 7% für Intron-haltige Gene, der damit unweit der Gesamt-genomischen Prozentigkeit von 5% liegt. Daher kann eine besondere Transport-Spezifität für Intron-haltige mRNAs durch Npl3p eher ausgeschlossen werden. Vielmehr bestätigt dieses Ergebnis das

bestehende Modell, in dem Npl3p über die RNA Polymerase II auf alle Transkripte ohne Spezifität für Intron-Status und bestimmte mRNA Klassen geladen wird (Lei *et al.*, 2001; Häcker & Krebber, 2004; Hurt *et al.*, 2004). Da Gbp2p und Hrb1p präferentiell gespleißte mRNAs binden und effektiv transportieren, sind auch damit die identifizierten starken Export Defekte von gbp2_cp-GFP und Hrb1_cp-GFP im Zellkern in Spleißingfaktor Mutanten erklärbar (Abb. 32 und 34). Hingegen können GFP-npl3_cp Export-Defekte nicht visualisiert werden, da keine besondere Präferenz in der mRNA Bindung von Intron-haltigen Transkripten besteht. Alle Intron-losen mRNAs (70%~75%) können von Npl3p trotz Spleißing-Defekte immer noch in das Zytoplasma exportiert werden (Abb. 32, 34).

4.2.10 Gbp2p und Hrb1p vermitteln den nukleären Export von gespleißten mRNAs

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nicht nur die Interaktion von Gbp2p und Hrb1p mit der mRNA in Spleißingfaktor Mutanten der Spätphase stark geschwächt, sondern dass als weitere Konsequenz durch das Fehlen dieser Proteine an der mRNA auch die Interaktion mit dem Export-Rezeptor Mex67p unterbunden wurde (Abb. 51 und Abb. 52). Npl3p zeigt weder in seiner Export-Rezeptor Bindung mit Mex67p noch in seiner mRNA Bindung signifikante Störungen in Spleißingfaktor Mutanten und könnte so den mRNA Export des Großteils an mRNAs, die kein Intron enthalten, gewährleisten (Abb. 56 und 57).

Gbp2p und Hrb1p können aufgrund der hier gezeigten Spleißing-Abhängigkeit, den effektiven Transport gespleißter mRNAs unter Wildtyp Bedingungen unterstützen und im Falle eines gestörten Spleißing Prozesses fehlerhaft prozessierte mRNAs durch ihre geschwächte bzw. fehlende Assoziation mit der mRNA und dem Export-Rezeptor im Zellkern zurückhalten. Die Abwesenheit von Gbp2p und Hrb1p im sich bildenden mRNP Komplex und die dadurch mangelnde Mex67p Interaktion könnte bereits frühzeitig zur Erkennung von unvollständig oder fehlerhaft gespleißten mRNAs beitragen.

In Experimenten zur Analyse von mRNA Export Defekten konnte gezeigt werden, dass in *prp8-908/988* und *prp17Δ* erst nach einer Temperaturverschiebung für 3 h nach 37°C leichte mRNA Export Defekte erkennbar werden (Abb. 49), der den Pool ungespleißter mRNAs anzeigt. Erstaunlicherweise zeigten die Deletionen von *gbp2Δ* und *hrb1Δ* sowie die Doppel-Deletion *gbp2Δ hrb1Δ* keine sichtbaren mRNA Export Defekte (Abb. 49). Nach Microarray und qRT-PCR Analysen binden Gbp2p und Hrb1p nur bestimmte Intron-haltige mRNAs (ribosomale Protein Gene, rRNA Prozessierungsfaktoren, Faktoren präribosomaler Reifungs- und Exportprozesse), die entsprechende Export-Defekte möglicherweise nicht erkennbar werden lassen. Interessanterweise sind jedoch insbesondere in der Kombination aus *gbp2Δ*

prp17Δ und *gbp2Δ prp8-908/988* als auch *hrb1Δ prp17Δ* und *hrb1Δ prp8-908/988* sehr viel stärkere mRNA Export Defekte sichtbar als in den Spleißingfaktor Mutanten allein (Abb. 49). Die Produktion Export kompetenter mRNA erfordert die kooperative Zusammenarbeit von Transkription, Spleißing und mRNA Export sowie einer mRNA Qualitätskontrolle (Casolari & Silver, 2004, Fasken & Corbett, 2009). Diese additiven mRNA Export Defekte könnten daher auf Störungen in einer kooperativen Spleißing- und Exportfunktion von Gbp2p und Hrb1p in Verbindung mit den analysierten Spleißingfaktoren beruhen. Es könnte aber auch sein, dass notwendige Transportfaktoren an ungespleißten mRNAs akkumulieren und der Export-Faktor depletierte Zustand in der Zelle synthetische mRNA Export-Defekte auslöst. Gbp2p und Hrb1p unterstützen den spezifischen Export von korrekt gespleißten mRNAs und halten diese im Kern zurück, wenn Störungen auftreten.

In diesen mRNA Export Analysen weisen auch die Kombinationen von *npl3Δ prp17Δ* und *npl3Δ prp8-908/988* punktuelle Subregionen von mRNA Ansammlungen im Zellkern auf (Abb. 49). Ein erheblicher Anteil an zytoplasmatisch verteilter mRNA kann jedoch nach wie vor in der Zelle visualisiert werden und zeigt daher nur einen leichten Export-Defekt an. (Abb. 49). Bekannt ist jedoch, dass frühe anormal prozessierte bzw. unprozessierte mRNAs auch in nukleären Subdomänen zeitweilig zurückgehalten werden können und auf diese Weise effektiv den Degradationen durch das Exosom zugeführt werden (Assenholt *et al.*, 2008; Fasken & Corbett, 2009). Möglich wäre, dass eine Störung der späten Spleißing Phase (*prp17Δ*, *prp8-908/988*) in Kombination mit einer beeinträchtigten spleißosomalen Assemblierung (*npl3Δ*) eine Pausierung der Transkription nach sich zieht, die auf diese Weise in den mRNA *in situ* Hybridisierungen sichtbar wird (Jensen *et al.* 2001a; Libri *et al.* 2002; Thomsen *et al.* 2003, Assenholt *et al.*, 2008).

4.2.11 Gbp2p und Hrb1p sind neu identifizierte Interaktionspartner von Mlp1p

In dieser Arbeit konnte auch eine vorhandene physikalische Interaktion von Gbp2p und Hrb1p mit dem Kernporen-Komplex assoziierten Faktor Mlp1p gezeigt werden (Abb. 53). Dieser Faktor wirkt als finale Qualitätskontrolle von mRNAs an den Kernporen-Komplexen kurz bevor diese den Zellkern verlassen. Des weiteren unterstützt Mlp1p die Konzentration der mRNPs an den Kernporen-Komplexen um ihren Transport zu effektivieren (Fasken & Corbett, 2009; Galy *et al.*, 2004; Palancade *et al.*, 2005; Abb. 68). Das Mlp1p ähnliche Mlp2p interagiert zudem mit Mex67p (Vinciguerra *et al.*, 2005; Kosova *et al.*, 2002; Strässer *et al.*, 2002). Deletionen von Mlp1p und Mlp2p sowie ihre Doppel-Deletion führen zu keinen mRNA Export Defekten und wurden daher nicht in Verbindung mit einer direkten Funktion im mRNA Transport gebracht. Vielmehr konzentriert sich ihre Funktion auf die Zurückhaltung

ungespleißter und auch falsch gefalteter mRNAs im Zellkern, die schließlich dem Abbau durch das Exosom zugeführt werden (Galy *et al.*, 2004; Vinciguerra *et al.*, 2005; Fasken & Corbett, 2009; Dziembowski *et al.*, 2004). Gbp2p und Hrb1p können durch ihre Interaktion mit Mlp1p die Erkennung und einen effektiven Export korrekt gespleißter mRNAs unterstützen. Aus diesen Daten ergibt sich abschließend folgendes Modell (Abb. 68): Npl3p wird in einer Frühphase der Transkription über die RNA Polymerase II auf die mRNA geladen. Npl3p ist eine Rekrutierungshilfe für die mRNA Assoziation von Spleißingfaktoren, die die spleißosomale Assemblierung initiieren. Gbp2p und Hrb1p werden während der Transkriptionselongation über den THO-Komplex zur mRNA rekrutiert.

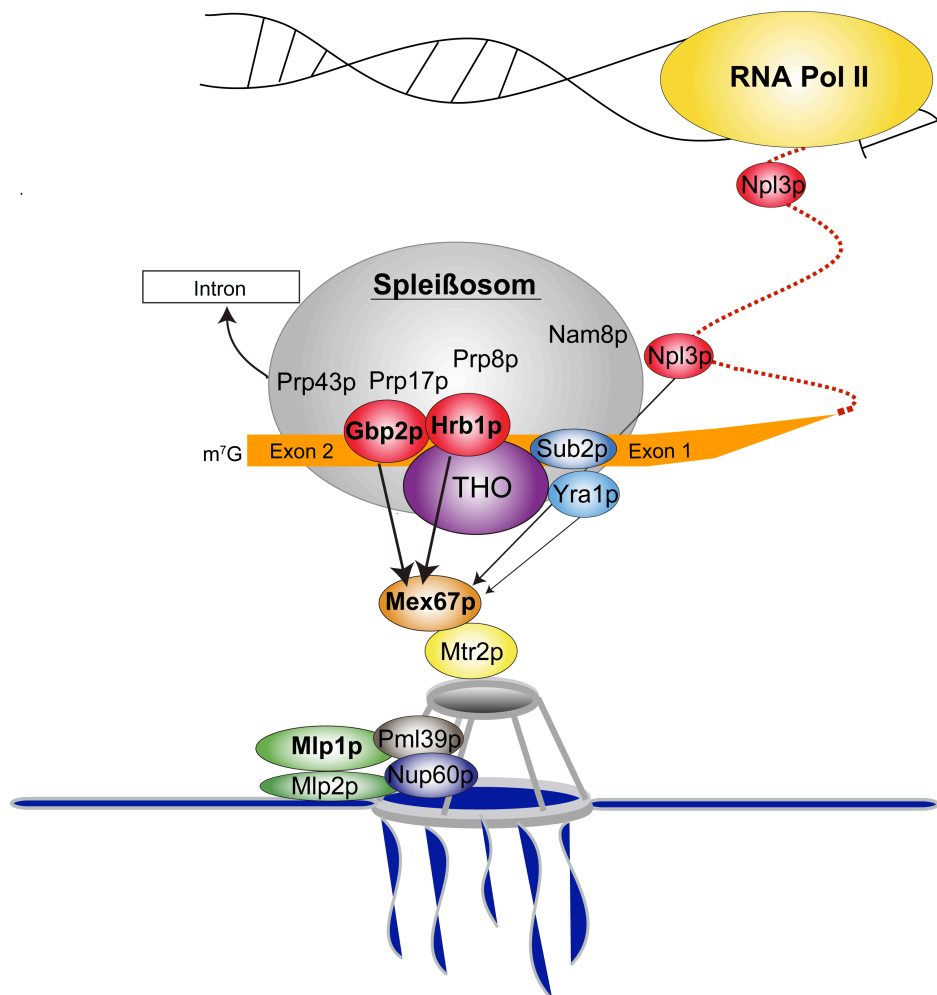


Abb. 68: Die pendelnden SR-ähnlichen Proteine Gbp2p und Hrb1p vermitteln den nukleären Export gespleißter mRNAs. Npl3p wird während der Transkriptionsinitiation über die RNA Polymerase II auf alle mRNAs geladen. Npl3p unterstützt die Rekrutierung der initialen U1 und U2 snRNP Spleißingfaktoren wie z.B. Nam8p. Gbp2p und Hrb1p kontaktieren über ihre Verbindung mit dem THO-Komplex aktiv transkribierte mRNAs während der Transkriptionselongation. Gbp2p und Hrb1p interagieren mit den Spleißingfaktoren der zweiten Spleißreaktion (Prp17p) und finalen Intron-Freisetzung und spleißosomalen Disassemblierung (Prp43p). Über diese Interaktion werden Gbp2p und Hrb1p für die spezifische Bindung gespleißter mRNAs rekrutiert. Gbp2p und Hrb1p unterstützen den Transport gespleißter mRNAs durch präferentielle mRNA Bindung und ihrer Direktinteraktion mit dem Export-Rezeptor Mex67p. An den Kernporen-Komplexen interagieren Npl3p, Gbp2p und Hrb1p mit Mlp1p. Dieser Faktor vollzieht eine finale Qualitätskontrolle für korrekt gespleißte mRNAs, bevor diese den Zellkern durch die Kernporen-Komplexe verlassen.

Diese Interaktionen unterstützen den Abschluß der späten Spleißing-Reaktionen und führen für Gbp2p und Hrb1p zur präferentiellen Bindung von gespleißten mRNAs (Abb. 68). Für einen effektiven Export-Prozess dieser mRNAs rekrutieren Gbp2p und Hrb1p den Export-Rezeptor Mex67p. Auf der mRNA Exportroute werden Gbp2p und Hrb1p von dem Kernporen-Komplex assoziierten Faktor Mlp1p in einer Direktinteraktion erkannt. Diese Interaktionen unterstützen eine finale Qualitätskontrolle gespleißter mRNAs an den Kernporen-Komplexen bevor diese den Zellkern verlassen (Abb. 68).

5. Literaturverzeichnis

- Aitchison J, G Blobel, MP Rout: (1992). "Kap104p: a karyopherin involved in the nuclear transport of messenger RNA binding proteins." Science **274**: 624-267.
- Amberg DC, Goldstein AL, Cole CN: (1992). "Isolation and characterization of RAT1: An essential gene of *Saccharomyces cerevisiae* required for the efficient nucleocytoplasmic trafficking of mRNA." Genes Dev **6**: 1173-1189.
- Amrani N, Minet M, Le Gouar M, Lacroute F, Wyers F: (1997). "Yeast Pab1 interacts with Rna15 and participates in the control of the poly(A) tail length in vitro." Mol Cell Biol. **17**(7): 3694-701.
- Andrulis ED, Zappulla DC, Ansari A, Perrod S, Laiosa CV, Gartenberg MR, Sternglanz R: (2002). "Esc1, a nuclear periphery protein required for Sir4-based plasmid anchoring and partitioning." Mol Cell Biol. **22**(23): 8292-301.
- Arenas J, Hurwitz J: (1987). "Purification of a RNA debranching activity from HeLa cells." J Biol Chem. **262**(9): 4274-9.
- Arenas JE, Abelson JN: (1997). "Prp43: An RNA helicase-like factor involved in spliceosome disassembly." Proc Natl Acad Sci U S A. **94**(22): 11798-802.
- Ares M Jr, Grate L, Pauling MH: (1999). "A handful of intron-containing genes produces the lion's share of yeast mRNA." RNA **5**(9): 1138-9.
- Assenholt J, Mouaikel J, Andersen KR, Brodersen DE, Libri D, Jensen TH: (2008). "Exonucleolysis is required for nuclear mRNA quality control in yeast THO mutants." RNA **14**(11): 2305-13.
- Ast G: (2004). "How did alternative splicing evolve?" Nat. Rev. Genet. **5**: 773-782.
- Auboeuf D, Honig A, Berget SM, O'Malley BW: (2002). "Coordinate regulation of transcription and splicing by steroid receptor coregulators. ." Science **298**: 416-419.
- Balakrishnan R, Christie KR, Costanzo MC, Dolinski K, Dwight S: (2005). "*Saccharomyces* Genome Database" <http://www.yeastgenome.org/>
- Bassler J, Grandi P, Gadal O, Lessmann T, Petfalski E, Tollervey D, Lechner J, Hurt E: (2001). "Identification of a 60S preribosomal particle that is closely linked to nuclear export." Mol Cell **8**(3): 517-29.
- Baurén G, Wieslander L: (1994). "Splicing of Balbiani ring 1 gene pre-mRNA occurs simultaneously with transcription." Cell. 1994 Jan 14;**76**(1):183-92. **76**(1): 183-92.
- Bednenko J, Cingolani G, Gerace L: (2003). "Importin beta contains a COOH-terminal nucleoporin binding region important for nuclear transport." J Cell Biol. **162**(3): 391-401.
- Ben-Yehuda S, Dix I, Russell CS, Levy S, Beggs JD, Kupiec M: (1998). "Identification and functional analysis of hPRP17, the human homologue of the PRP17/CDC40 yeast gene involved in splicing and cell cycle control." RNA. **4**(10): 1304-12.

- Ben-Yehuda S, Dix I, Russell CS, McGarvey M, Beggs JD, Kupiec M: (2000). "Genetic and physical interactions between factors involved in both cell cycle progression and pre-mRNA splicing in *Saccharomyces cerevisiae*." Genetics **156**(4): 1503-17.
- Beyer AL, Osheim YN: (1988). "Visualization of RNA transcription and processing." Semin Cell Biol **2**(2): 131-40.
- Birney E, Kumar S, Krainer AR: (1993). "Analysis of the RNA-recognition motif and RS and RGG domains: conservation in metazoan pre-mRNA splicing factors." Nucleic Acids Res. **21**(25): 5803-16.
- Bischoff FR, Krebber H, Smirnova E, Dong W, Ponstingl H: (2002). "How Ran is regulated." Results Probl Cell Differ **35**: 49-66.
- Bischoff. FR, Scheffzek K, Ponstingl H: (2002). "How Ran is regulated." Results Probl Cell Differ **35**: 49-66.
- Black DL: (2003). "Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing." Annu Rev Biochem. **72**: 291-336.
- Blaustein M, Pelisch F, Tanos T, Muñoz MJ, Wengier D, Quadrana L, Sanford JR, Muschietti JP, Kornblihtt AR, Cáceres JF, Coso OA, Srebrow A: (2005). "Concerted regulation of nuclear and cytoplasmic activities of SR proteins by AKT." Nat Struct Mol Biol. **12**(12): 1037-44.
- Blencowe BJ: (2006). "Alternative splicing: new insights from global analyses." Cell. **126**(1): 37-47.
- Boon KL, Auchynnikava T, Edwards-Gilbert G, Barrass D, Droop AP, Dez C, Beggs JD: (2006). "Yeast ntr1/spp382 mediates prp43 function in postsplceosomes." Mol Cell Biol **26**(16): 6016-23.
- Bourgeois CF, Lejeune F, Stévenin J: (2004). "Broad specificity of SR (serine/arginine) proteins in the regulation of alternative splicing of pre-messenger RNA." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol. **78**: 37-88.
- Bradatsch B, Katahira J, Kowalinski E, Bange G, Yao W, Sekimoto T, Baumgärtel V, Boese G, Bassler J, Wild K, Peters R, Yoneda Y, Sinning I, Hurt E: (2007). "Arx1 functions as an unorthodox nuclear export receptor for the 60S preribosomal subunit." Mol Cell **27**(5): 767-79.
- Brodsky AS, Silver PA: (2000). "Pre-mRNA processing factors are required for nuclear export. ." RNA **6**(12): 1737-49
- Brow DA: (2002). "Allosteric cascade of spliceosome activation." Annu Rev Genet. **36**: 333-60.
- Brys A, Schwer B: (1996). "Requirement for *SLU7* in yeast pre-mRNA splicing is dictated by the distance between the branchpoint and the 3' splice site." RNA. **2**(7): 707-17.
- Bucheli ME, Buratowski S: (2005). "Npl3 is an antagonist of mRNA 3' end formation by RNA polymerase II." EMBO J. **24**(12): 2150-60.

- Bucheli ME, He X, Kaplan CD, Moore CL, Buratowski S: (2007). "Polyadenylation site choice in yeast is affected by competition between Npl3 and polyadenylation factor CFI." RNA. 2002 Oct;8(10):1233-41. **13**(10): 1756-64.
- Burd CG, Dreyfuss G: (1994). "Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins." Science. **265**(5172): 615-21.
- Butler G, Wolfe KH: (1994). "Yeast homologue of mammalian Ran binding protein 1." Biochim Biophys Acta **1219**(3): 711-2.
- Cáceres JF, Screatton GR, Krainer AR: (1998). "A specific subset of SR proteins shuttles continuously between the nucleus and the cytoplasm." Genes Dev. **12**(1): 55-66.
- Casolari JM, Brown CR, Komili S, West J, Hieronymus H, Silver PA: (2004). "Genome-wide localization of the nuclear transport machinery couples transcriptional status and nuclear organization." Cell **117**(4): 427-39.
- Chávez S, Aguilera A: (1997). "The yeast HPR1 gene has a functional role in transcriptional elongation that uncovers a novel source of genome instability." Genes Dev **11**(24): 3459-70.
- Chávez S, Beilharz T, Rondón AG, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Svejstrup JQ, Lithgow T, Aguilera A: (2000). "A protein complex containing Tho2, Hpr1, Mft1 and a novel protein, Thp2, connects transcription elongation with mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*." EMBO J. **19**(21): 5824-34.
- Chekanova JA, Abruzzi KC, Rosbash M, Belostotsky DA: (2008). "Sus1, Sac3, and Thp1 mediate post-transcriptional tethering of active genes to the nuclear rim as well as to non-nascent mRNP." RNA **14**(1): 66-77.
- Chen CH, Tsai WY, Chen HR, Wang CH, Cheng SC: (2001). "Identification and characterization of two novel components of the Prp19p-associated complex, Ntc30p and Ntc20p." J Biol Chem. **276**(1): 488-94.
- Chen CH, Yu WC, Tsao TY, Wang LY, Chen HR, Lin JY, Tsai WY, Cheng SC: (2002). "Functional and physical interactions between components of the Prp19p-associated complex." Nucleic Acids Res. **30**(4): 1029-37.
- Chen HR, Jan SP, Tsao TY, Sheu YJ, Banroques J, Cheng SC: (1998). "Snt309p, a component of the Prp19p-associated complex that interacts with Prp19p and associates with the spliceosome simultaneously with or immediately after dissociation of U4 in the same manner as Prp19p." Mol Cell Biol. **18**(4): 2196-204.
- Chi NC, Adam EJ, Adam SA: (1995). "Sequence and characterization of cytoplasmic nuclear protein import factor p97." J Cell Biol **130**: 265-274.
- Chua K, Reed R: (1999a). "An upstream AG determines whether a downstream AG is selected during catalytic step II of splicing." Mol Cell Biol. **21**(5): 1509-14.
- Clouse KN, Luo MJ, Zhou Z, Reed R: (2001). "A Ran-independent pathway for export of spliced mRNA." Nat Cell Biol **3**: 97-99.
- Colot HV, Stutz F, Rosbash M: (1996). "The yeast splicing factor Mud13p is a commitment complex component and corresponds to CBP20, the small subunit of the nuclear cap-binding complex." Genes Dev. **10**(13): 1699-708.

Conrad NK, Wilson SM, Steinmetz EJ, Patturajan M, Brow DA, Swanson MS, Corden JL: (2000). "A yeast heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex associated with RNA polymerase II." Genetics. **154**(2): 557-71.

Conti E, Izaurralde E: (2001). "Nucleocytoplasmic transport enters the atomic age." Curr Opin Cell Biol **13**(3): 310-9.

Coppola JA, Field AS, Luse DS: (1983). "Promoter-proximal pausing by RNA polymerase II in vitro: transcripts shorter than 20 nucleotides are not capped." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(5): 1251-5.

Corbett AH, Krebber H: (2004). "Hot trends erupting in the nuclear transport field. Workshop on mechanisms of nuclear transport." EMBO Rep. **5**(5): 453-8.

Cormack BP, Struhl K: (1992). "The TATA-binding protein is required for transcription by all three nuclear RNA polymerases in yeast cells." Cell. **69**(4): 685-96.

Cronshaw JM, Krutchinsky AN, Zhang W, Chait BT, Matunis MJ: (2002). "Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex." J Cell Biol **158**(5): 915-27.

Dagher SF, Fu XD: (2001). "Evidence for a role of Sky1p-mediated phosphorylation in 3' splice site recognition involving both Prp8 and Prp17/Slu4." RNA. 2002 Oct;**8**(10):1233-41. **7**(9): 1284-97.

Das B, Butler JS, Sherman F: (2003). "Degradation of normal mRNA in the nucleus of *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Cell Biol. **23**(16): 5502-5515.

Das B, Guo Z, Russo P, Chartrand P, Sherman F: (2000). "The role of nuclear Cap binding protein Cbc1p of yeast in mRNA termination and degradation." Mol Cell Biol. **20**(8): 2827-2838.

Davis CA, Grate L, Spingola M, Ares M Jr: (2000). "Test of intron predictions reveals novel splice sites, alternatively spliced mRNAs and new introns in meiotically regulated genes of yeast." Nucleic Acids Res. **28**(8): 1700-6.

Davletov B, Jiménez JL: (2004). "Sculpting a domain by splicing." Nat Struct Mol Biol. **11**(1): 4-5.

De la Cruz J, Sanz-Martínez EE, Remacha M: (2005). "The essential WD-repeat protein Rsa4p is required for rRNA processing and intra-nuclear transport of 60S ribosomal subunits." Nucleic Acids Res. **33**(18): 5728-39.

Deka P, Bucheli ME, Moore C, Buratowski S, Varani G: (2008). "Structure of the yeast SR protein Npl3 and Interaction with mRNA 3'-end processing signals." J Mol Biol **375**(1): 136-50.

Denning D, Mykytka B, Allen NP, Huang L, Al B, Rexach M: (2001). "The nucleoporin Nup60p functions as a Gsp1p-GTP-sensitive tether for Nup2p at the nuclear pore complex." J Cell Biol **154**: 937-50.

Dermody JL, Dreyfuss JM, Villén J, Ogundipe B, Gygi SP, Park PJ, Ponticelli AS, Moore CL, Buratowski S, Bucheli ME: (2008). "Unphosphorylated SR-like protein Npl3 stimulates RNA polymerase II elongation." PLoS One. 2008 Sep 26;**3**(9):e3273. **3**(9): e3273.

Dilworth DJ, Suprpto A, Padovan JC, Chait BT, Wozniak R W, Rout MP, Aitchison JD: (2001). "Nup2p dynamically associates with the distal regions of the yeast nuclear pore complex." J Cell Biol **153**: 1465-78.

Dziembowski A, Ventura AP, Rutz B, Caspary F, Faux C, Halgand F, Lapr  v  te O, Séraphin B: (2004). "Proteomic analysis identifies a new complex required for nuclear pre-mRNA retention and splicing." EMBO J **23**(24): 4847-56.

Eisinger DP, Dick FA, Denke E, Trumpower BL: (1997). "SQT1, which encodes an essential WD domain protein of *Saccharomyces cerevisiae*, suppresses dominant negative mutations of the ribosomal protein gene QSR1." Mol Cell Biol **17**(9): 5146-55.

El-Baradi TT, Raue HA, De Regt VC, Verbree EC, Planta RJ: (1985). (Yeast ribosomal protein L25 binds to an evolutionary conserved site on yeast 26S and *E. coli* 23S rRNA.). "EMBO J." **4**: 2101-7.

Elliott DJ, Rosbash M: (1996). "Yeast pre-mRNA is composed of two populations with distinct kinetic properties." Exp Cell Res **229**(2): 181-8.

Enenkel C, Blobel G, Rexach M: (1995). "Identification of a yeast karyopherin heterodimer that targets import substrate to mammalian nuclear pore complexes." J Biol Chem **270**: 16499-16502.

Estruch F, Coledagger M: (2003). "An early function during transcription for the yeast mRNA export factor Dbp5p/Rat8p suggested by its genetic and physical interactions with transcription factor IIH components." Mol Biol Cell **14**(4): 1664-76.

Fabre E, Hurt E: (1997). "Yeast genetics to dissect the nuclear pore complex and nucleocytoplasmic trafficking." Annu Rev Genet. **31**: 277-313.

Fahrenkrog B, Hurt E, Aebi U, Pant   N: (1998). "Molecular architecture of the yeast nuclear pore complex: localization of Nsp1p subcomplexes." J Cell Biol **143**(3): 577-88.

Fasken MB, Corbett AH: (2009). "Mechanisms of nuclear mRNA quality control." RNA Biol **6**(3): 237-41.

Fasken MB, Stewart M, Corbett A: (2008). "Functional significance of the interaction between the mRNA-binding protein, Nab2, and the nuclear pore-associated protein, Mlp1, in mRNA export." J Biol Chem. **283**(40): 27130-43.

Fatica A, Oeffinger M, Dlakic M, Tollervey D: (2003). "Nob1p is required for cleavage of the 3' end of 18S rRNA." Mol Cell Biol **23**(5): 1798-807.

Faustino NA, Cooper TA: (2003). "Pre-mRNA splicing and human disease." Genes Dev. **17**(4): 419-37.

Fischer T, Rodríguez-Navarro S., Pereira G, R  cz A, Schiebel E, Hurt E: (2004). "Yeast centrin Cdc31 is linked to the nuclear mRNA export machinery." Nat Cell Biol. **6**(9): 840-8.

Fischer T, Strässer K, R  cz A, Rodriguez-Navarro S, Oppizzi M, Ihrig P, Lechner L, Hurt E: (2002). "The mRNA export machinery requires the novel Sac3p-Thp1p complex to dock at the nucleoplasmic entrance of the nuclear pores." EMBO J **21**(21): 5843-52.

Flaherty SM, Fortes P, Izaurralde E, Mattaj IW, Gilmartin GM: (1997). "Participation of the nuclear cap binding complex in pre-mRNA 3' processing." Proc Natl Acad Sci U S A. **94**(22): 11893-8.

Fleischer TC, Weaver CM, McAfee KJ, Jennings JL, Link AJ: (2006). "Systematic identification and functional screens of uncharacterized proteins associated with eukaryotic ribosomal complexes." Genes Dev. **20**(10): 1294-307.

Fornerod M, Ohno M, Yoshida M, Mattaj IW: (1997). "Crm1 is an export receptor for leucine rich nuclear export signals." Cell **90**: 1051-1060.

Frank D, Guthrie C: (1992). "An essential splicing factor, *SLU7*, mediates 3' splice site choice in yeast." Genes Dev **6**(11): 2112-24.

Franke WW, Scheer U: (1970). "The ultrastructure of the nuclear envelope of amphibian oocytes: a reinvestigation. I. The mature oocyte." J Ultrastruct Res. **30**(3): 288-316.

Fried H, Kutay U: (2003). "Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory." Cell Mol Life Sci. **60**(8): 1659-88.

Gadal O, Strauss D., Kessl J, Trumpower B, Tollervey D, Hurt E: (2001). "Nuclear export of 60s ribosomal subunits depends on Xpo1p and requires a nuclear export sequence-containing factor, Nmd3p, that associates with the large subunit protein Rpl10p." Mol Cell Biol. **21**(10): 3405-15.

Galani K, Nissan TA, Petfalski E, Tollervey D, Hurt E: (2004). "Rea1, a dynein-related nuclear AAA-ATPase, is involved in late rRNA processing and nuclear export of 60 S subunits." J Biol Chem **279**(53): 55411-8.

Gallardo M, Luna R, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Aguilera A: (2003). "Nab2p and the Thp1p-Sac3p complex functionally interact at the interface between transcription and mRNA metabolism." J Biol Chem. **278**(26): 24225-32.

Galy V, Gadal O, Fromont-Racine M, Romano A, Jacquier A, Nehrbass U: (2004). "Nuclear retention of unspliced mRNAs in yeast is mediated by perinuclear Mlp1." Cell. **116**(1): 63-73.

Galy V, Olivo-Marin JC, Scherthan H, Doye V, Rascalou N, Nehrbass U: (2000). "Nuclear pore complexes in the organization of silent telomeric chromatin." Nature **403**(6765): 108-12.

Gama-Carvalho M, Carvalho MP, Kehlenbach A, Valcarcel J, Carmo-Fonseca M: (2001). "Nucleocytoplasmic shuttling of heterodimeric splicing factor U2AF." J Biol Chem. **276**(16): 13104-12.

Gilbert W, Guthrie C: (2004). "The Glc7p nuclear phosphatase promotes mRNA export by facilitating association of Mex67p with mRNA." Mol Cell. **13**(2): 201-12.

Gilbert W, Siebel CW, Guthrie C: (2001). "Phosphorylation by Sky1p promotes Npl3p shuttling and mRNA dissociation." RNA. 2002 Oct;**8**(10):1233-41. **7**(2): 302-13.

González-Aguilera C, Tous C, Gómez-González B, Huertas P, Luna R, Aguilera A: (2008). "The THP1-SAC3-SUS1-CDC31 complex works in transcription elongation-mRNA export preventing RNA-mediated genome instability." Mol Biol Cell. **19**(10): 4310-8.

Görlich D, Kostka S, Kraft R, Dingwall C, Laskey RA, Hartmann E, Prehn S: (1995). "Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope." Curr Biol **5**: 383-392.

Gorlich D, Kutay U: (1999). "Transport between the cell nucleus and the cytoplasm." Annu Rev Cell Dev Biol(15): 607-60.

Görlich D, Mattaj IW: (1996). "Nucleocytoplasmic transport." Science **271**(5255): 1513-8.

Gottschalk A, Kastner B, Lührmann R, Fabrizio P: (2001). "The yeast U5 snRNP coisolated with the U1 snRNP has an unexpected protein composition and includes the splicing factor Aar2p." RNA **7**(11): 1554-65.

Gozani O, Feld R, Reed R: (1996). "Evidence that sequence-independent binding of highly conserved U2 snRNP proteins upstream of the branch site is required for assembly of spliceosomal complex A." Genes Dev. **10**(2): 233-43.

Grainger RJ, Beggs JD: (2005). "Prp8 protein: at the heart of the spliceosome." RNA. **11**(5): 533-57.

Graveley BR, Maniatis T: (1998). "Arginine/serine-rich domains of SR proteins can function as activators of pre-mRNA splicing." Mol Cell. **1**(5): 765-71.

Green DM, Johnson CP, Hagan H, Corbett AH: (2003). "The C-terminal domain of myosin-like protein 1 (Mlp1p) is a docking site for heterogeneous nuclear ribonucleoproteins that are required for mRNA export." Proc Natl Acad Sci U S A. **100**(3): 1010-5.

Schwer B, Gross CH: 1998). "Prp22, a DEXH-box RNA helicase, plays two distinct roles in yeast pre-mRNA splicing." EMBO J. **17**(7): 2086–2094. .

Gross T, Siepmann A, Sturm D, Windgassen M, Scarcelli JJ, Seedorf M, Cole CN, Krebber H: (2007). "The DEAD-box RNA helicase Dbp5 functions in translation termination." Science. **315**(5812): 646-9.

Häcker S, Krebber H: (2003). "Differential export requirements for shuttling serine/arginine-type mRNA-binding proteins." J Biol Chem. **279**(7): 5049-52.

Hargous Y, Hautbergue GM, Tintaru AM, Skrisovska L, Golovanov AP, Stevenin J, Lian LY, Wilson SA, Allain FH: (2006). "Molecular basis of RNA recognition and TAP binding by the SR proteins SRp20 and 9G8." EMBO J. **25**(21): 5126-37.

Hautbergue GM, Hung ML, Golovanov AP, Lian LY, Wilson SA: (2008). "Mutually exclusive interactions drive handover of mRNA from export adaptors to TAP." Proc Natl Acad Sci U S A. **105**(13): 5154-9.

Hector RE, Nykamp KR, Anderson JT, Non PJ, Urbinati CR, Wilson SM, Minvielle-Sebastia L, Swanson MS: (2002). "Dual requirement for yeast hnRNP Nab2p in mRNA poly(A) tail length control and nuclear export " The EMBO Journal **21**: 1800-1810.

Hedges J, West M, Johnson AW: (2005). "Release of the export adapter, Nmd3p, from the 60S ribosomal subunit requires Rpl10p and the cytoplasmic GTPase Lsg1p." EMBO J Biol Chem **24**(3): 567-79.

- Henry MF, Silver PA: (1996). "A novel methyltransferase (Hmt1p) modifies poly(A)+-RNA-binding proteins." Mol Cell Biol. **16**(7): 3668-78.
- Hieronymus H, Yu MC, Silver PA: (2001). "Genome-wide mRNA surveillance is coupled to mRNA export." Genes Dev. **18**(21): 2652-62.
- Hirose Y, Tacke R, Manley JL: (1999). "Phosphorylated RNA polymerase II stimulates pre-mRNA splicing." Genes Dev. **13**(10): 1234-9.
- Ho JH, Kallstrom G, Johnson AW: (2000). "Nmd3p is a Crm1p-dependent adapter protein for nuclear export of the large ribosomal subunit." J Cell Biol **151**(5): 1057-66.
- Hong B, Wu K, Brockenbrough JS, Wu P, Aris JP: (2001). "Temperature sensitive nop2 alleles defective in synthesis of 25S rRNA and large ribosomal subunits in *Saccharomyces cerevisiae*." Nucleic Acids Res. **29**(14): 2927-37.
- Horowitz DS, Krainer AR: (1997). "A human protein required for the second step of pre-mRNA splicing is functionally related to a yeast splicing factor." Genes Dev. **11**(1): 139-51.
- Huang, Y., Carmichael, G.G: (1996a). "Role of polyadenylation in nucleocytoplasmic transport of mRNA." Mol. Cell. Biol. **16**: 1534-1542.
- Huang Y, Steitz JA: (2001). "Splicing factors SRp20 and 9G8 promote the nucleocytoplasmic export of mRNA." Mol Cell. **7**(4): 899-905.
- Huang Y, Yario TA, Steitz JA: (2004). "A molecular link between SR protein dephosphorylation and mRNA export." Proc Natl Acad Sci U S A. **101**(26): 9666-70.
- Huang ZH, Gu D, Lange Y, Mazzone T: (2003). "SR splicing factors serve as adapter proteins for TAP-dependent mRNA export." Biochemistry. **42**(13): 3949-55.
- Huber J, Cronshagen U, Kadokura M, Marshallsay C, Wada T, Sekine M, Lührmann R: (1998). "Snurportin1, an m3G-cap-specific nuclear import receptor with a novel domain structure." EMBO J **17**: 4114-4126.
- Huertas P, García-Rubio ML, Wellinger RE, Luna R, Aguilera A: (2006). "An hpr1 point mutation that impairs transcription and mRNP biogenesis without increasing recombination." Mol Cell Biol. **26**(20): 7451-65.
- Hung NJ, Johnson AW: (2006). "Nuclear recycling of the pre-60S ribosomal subunit-associated factor Arx1 depends on Rei1 in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Cell Biol. **26**(10): 3718-27.
- Hung NJ, Lo KY, Patel SS, Helmke K, Johnson AW: (2008). "Arx1 is a nuclear export receptor for the 60S ribosomal subunit in yeast." Mol Biol Cell **19**(2): 735-44.
- Hurt E, Luo MJ, Röther S, Reed R, Sträßer K: (2004). "Cotranscriptional recruitment of the serine-arginine-rich (SR)-like proteins Gbp2 and Hrb1 to nascent mRNA via the TREX complex." Proc Natl Acad Sci USA **101**: 1858-1862.
- Izaurralde E: (2004). "Directing mRNA export." Nat Struct Mol Biol. **11**(4): 210-2.
- Jäkel S, Görlich D: (1998). "Importin beta, transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells." EMBO J **17**: 4491-4502.

Jani D, Lutz S, Marshall NJ, Fischer T, Köhler K, Ellisdon AM, Hurt E, Stewart M: (2009). "Sus1, Cdc31, and the Sac3 CID region form a conserved interaction platform that promotes nuclear pore association and mRNA export. " Mol Cell **33**(6): 727-37.

Jenny A, Hauri HP, Keller W: (1994). "Characterization of cleavage and polyadenylation specificity factor and cloning of its 100-kilodalton subunit." Mol Cell Biol. **14**(12): 8183-90.

Jenny A, Keller W: (1995). "Cloning of cDNAs encoding the 160 kDa subunit of the bovine cleavage and polyadenylation specificity factor." Nucleic Acids Res. **23**(14): 2692-35.

Jensen, TH, Patricio K, McCarthy T, Rosbash M: (2001b). "A block to mRNA nuclear export in *S. cerevisiae* leads to hyperadenylation of transcripts that accumulate at the site of transcription " Mol. Cell **7**: 887–898.

Jensen TH, Boulay J, Rosbash M, Libri D: (2001). "The DECD box putative ATPase Sub2p is an early mRNA export factor." Curr Biol. **11**(21): 1711-5.

Jimeno S, Aguilera A: (2010). "The THO complex as a key mRNP biogenesis factor in development and cell differentiation." J Biol. **9**(1): 6.

Johnson AW, Lund E, Dahlberg J: (2002). "Nuclear export of ribosomal subunits." Trends Biochem Sci. **27**(11): 580-5.

Jones MH, Frank DN, Guthrie C: (1995). "Characterization and functional ordering of Slu7p and Prp17p during the second step of pre-mRNA splicing in yeast." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(21): 9687-91.

Jove R, Manley JL: (1984). "In vitro transcription from the adenovirus 2 major late promoter utilizing templates truncated at promoter-proximal sites." J Biol Chem. **259**(13): 8513-21.

Juneau K, Miranda M, Hillenmeyer M, Nislow C, Davis R: (2006). "Introns regulate RNA and Protein Abundance in Yeast." Genetics **174**(1): 511-518.

Jurica MS, Moore MJ: (2003). "Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins." Mol Cell. **12**(1): 5-14.

Kadener S, Fededa JP, Rosbash M, Kornblihtt AR: (2002). "Regulation of alternative splicing by a transcriptional enhancer through RNA pol II elongation. " Proc Natl Acad Sci USA **99**: 8185-8190.

Kaffman A, O'Shea EK: (1999). "Regulation of nuclear localization: a key to a door." Annu Rev Cell Dev Biol. **15**: 291-339.

Kandels-Lewis S, Séraphin B: (1993). "Involvement of U6 snRNA in 5' splice site selection." Science. **262**(5142): 2035-9.

Kessler MM, Henry MF, Shen E, Zhao J, Gross S, Silver PA, Moore CL: (1997). "Hrp1, a sequence-specific RNA-binding protein that shuttles between the nucleus and the cytoplasm, is required for mRNA 3'-end formation in yeast." Genes Dev. **11**(19): 2545-56.

Kessler SH, Sachs AB: (1998). "RNA recognition motif 2 of yeast Pab1p is required for its functional interaction with eukaryotic translation initiation factor 4G." Mol Cell Biol. **18**(1): 51-7.

- Kim Guisbert K, Duncan K, Li H, Guthrie C: (2005). "Functional specificity of shuttling hnRNPs revealed by genome-wide analysis of their RNA binding profiles." RNA. **11**(4): 383-93.
- Kiseleva E, Allen TD, Rutherford S, Bucci M, Wentz SR, Goldberg MW (2004). "Yeast nuclear pore complexes have a cytoplasmic ring and internal filaments." J Struct Biol **145**(3): 272-88.
- Klann E, Dever TE: (2004). "Biochemical mechanisms for translational regulation in synaptic plasticity." Nat Rev Neurosci. **5**(12): 931-42.
- Kohler A, Hurt E: (2007). "Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(10): 761-73.
- Konforti BB, Koziolkiewicz MJ, Konarska MM: (1993). "Disruption of base pairing between the 5' splice site and the 5' end of U1 snRNA is required for spliceosome assembly." Cell. **75**(5): 863-73.
- Konforti BB, Konarska MM: (1994). "U4/U5/U6 snRNP recognizes the 5' splice site in the absence of U2 snRNP." Genes Dev. **15**(8): 1962-73.
- Konkel LMC, Enomoto S, Chamberlain EM, McCune-Zierath P, Iyadurai SJP, Berman J: (1995). "A class of single-stranded telomeric DNA-binding proteins required for Rap1p localization in yeast nuclei." Proc Natl Acad Sci USA **92**: 5558-5562.
- Kosova B, Panté N, Rollenhagen C, Podtelejnikov A, Mann M, Aeby U, Hurt E: (2000). "Mlp2p, a component of nuclear pore attached intranuclear filaments, associates with nic96p." J Biol Chem. **275**(1): 343-50.
- Kosugi S, Hasebe M, Tomita M, Yanagawa H: (2008). "Nuclear export signal consensus sequences defined using a localization-based yeast selection system." Traffic **9**(12): 2053-62.
- Kotovic KM, Lockshon D, Boric L, Neugebauer KM: (2003). "Cotranscriptional recruitment of the U1 snRNP to intron-containing genes in yeast." Mol Cell Biol. **23**(16): 5768-79.
- Kress TL, Krogan NJ, Guthrie C: (2008). "A single SR-like protein, Npl3, promotes pre-mRNA splicing in budding yeast." Mol Cell. **32**(5): 727-34.
- Kressler D, Hurt E, Bassler J: (2010). "Driving ribosome assembly." Biochim Biophys Acta. **1803**(6): 673-683.
- Kuhn AN, Li Z, Brow DA: (1999). "Splicing factor Prp8 governs U4/U6 RNA unwinding during activation of the spliceosome." Mol Cell. **3**(1): 65-75.
- Kunzler M, Hurt E: (2001). "Targeting of Ran: variation on a common theme? ." J Cell Sci. **114**(Pt18): 3233-41.
- Lacadie SA, Tardiff DF, Kadener S, Rosbash M: (2006). "In vivo commitment to yeast cotranscriptional splicing is sensitive to transcription elongation mutants." Genes Dev. **20**(15): 2055-66.
- Lam BJ, Hertel KJ: (2002). "A general role for splicing enhancers in exon definition." RNA. **2002 Oct**; **8**(10):1233-41. **8**(10): 1233-41.

- Le Fur G, Burgevin MC, Malgouris C, Uzan A: (1979). "Differential effects of typical and atypical neuroleptics on alpha-noradrenergic and dopaminergic post synaptic receptors." Neuropharmacology. **18**(7): 591-4.
- Lebreton A, Saveanu C, Decourty L, Rain JC, Jacquier A, Fromont-Racine M: (2006). "A functional network involved in the recycling of nucleocytoplasmic pre-60S factors." J Cell Biol **173**(3): 349-360.
- Lee DCY, Aitchison JD: (1999). "Kap104p-mediated nuclear import." J Biol Chem **274**: 29031-29037.
- Lee MS, Henry M, Silver PA: (1996). "A protein that shuttles between the nucleus and the cytoplasm is an important mediator of RNA export." Genes Dev. **10**(10): 1233-46.
- Lei EP, Krebber H, Silver PA: (2001). "Messenger RNAs are recruited for nuclear export during transcription." Genes Dev. **15**(14): 1771-82.
- Lei EP, Silver PA: (2002). "Intron status and 3'-end formation control cotranscriptional export of mRNA." Genes Dev **16**: 2761-2766.
- LeMaire MF, Thummel CS: (1990). "Splicing precedes polyadenylation during Drosophila E74A transcription." Mol Cell Biol. **10**(11): 6059-63.
- Lewis JD, Izaurralde E: (1997). "The role of the cap structure in RNA processing and nuclear export." Eur J Biochem. **247**(2): 461-9.
- Libri D, Dower K, Boulay J, Thomsen R, Rosbash M, Jensen TH: (2002). "Interactions between mRNA export commitment, 3'-end quality control, and nuclear degradation." Mol Cell Biol. **22**(23): 8254-66.
- Lim RY, Aebi U, Fahrenkrog B: (2008). "Towards reconciling structure and function in the nuclear pore complex." Histochem Cell Biol. **129**(2): 105-16.
- Lim RY, Fahrenkrog B: (2006). "The nuclear pore complex up close.v." Curr Opin Cell Biol. **18**(3): 342-7.
- Lin JJ, Zakian VA: (1994). "Isolation and characterization of two *Saccharomyces cerevisiae* genes that encode proteins that bind to (TG1-3)_n single strand telomeric DNA in vitro." Nucleic Acids Res. **22**(23): 4906-13.
- Lin S, Fu XD: (2007). "SR proteins and related factors in alternative splicing." Adv Exp Med Biol. **623**: 107-22.
- Lindsey LA, Garcia-Blanco MA: (1998). "Functional conservation of the human homolog of the yeast pre-mRNA splicing factor Prp17p." J Biol Chem. **273**(49): 32771-5.
- Lo KY, Johnson AW: (2009). "Reengineering ribosome export." Mol Biol Cell **20**(5): 1545-54.
- Lo SJ, Lee CC, Lai HJ: (2006). "The nucleolus: reviewing oldies to have new understandings." Cell Res. **16**(6): 530-8.
- Lopez PJ, Séraphin B: (1999). "Genomic-scale quantitative analysis of yeast pre-mRNA splicing: implications for splice-site recognition." RNA **5**(9): 1135-7.

Lukasiewicz R, Velazquez-Dones A, Huynh N, Hagopian J, Fu XD, Adams J, Ghosh G: (2007). "Structurally unique yeast and mammalian serine-arginine protein kinases catalyze evolutionarily conserved phosphorylation reactions." J Biol Chem. **282**(32): 23036-43.

Macara IG: (2001). "Transport into and out of the nucleus." Microbiol Mol Biol Rev **65**(4): 570-94.

Madhani HD, Guthrie C: (1992). "A novel base-pairing interaction between U2 and U6 snRNAs suggests a mechanism for the catalytic activation of the spliceosome." Cell. **71**(5): 803-17.

Maniatis, T: (1991). "Mechanisms of alternative pre-mRNA splicing." Science. **251**(4989): 33-4.

Maquat LE: (2004). "Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics." Nat Rev Mol Cell Biol. **5**(2): 89-99.

Martin A, Schneider S, Schwer B: (2002). "Prp43 is an essential RNA-dependent ATPase required for release of lariat-intron from the spliceosome." J Biol Chem **277**(20): 17743-50

Mattaj JW, Englmeier L: (1998). "Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase." AnnuRev Biochem **67**: 265-306.

Maul, G: (1977). "The nuclear and the cytoplasmic pore complex: structure, dynamics, distribution, and evolution." Int Rev Cytol Suppl **6**: 75-186.

Mayes AE, Verdone L, Legrain P, Beggs JD: (1999). "Characterization of Sm-like proteins in yeast and their association with U6 snRNA." EMBO J. **18**(15): 4321-31.

McBride AE, Cook JT Stemmler EA, Rutledge KL, McGrath KA, Rubens JA: (2005). "Arginine methylation of yeast mRNA-binding protein Npl3 directly affects its function, nuclear export, and intranuclear protein interactions." J Biol Chem. **280**(35): 30888-98.

McBride AE, Zurita-Lopez C, Regis A, Blum E, Conboy A, Elf S, Clarke S: (2007). "Protein arginine methylation in *Candida albicans*: role in nuclear transport." Eukaryot Cell. **6**(7): 1119-29.

Michael WM, Choi M, Dreyfuss G: (1995). "A nuclear export signal in hnRNP A1: a signal-mediated, temperature-dependent nuclear protein export pathway." Cell. **83**(3): 415-22.

Milkereit P, Gadal O, Podtelejnikov A, Trumtel S, Gas N, Petfalski E, Tollervey D, Mann, Hurt E, Tschochner H: (2001). "Maturation and intranuclear transport of preribosomes requires Noc proteins." Cell **105**(4): 499-509.

Milkereit P, Strauss D, Bassler J, Gadal O, Kuhn H, Schutz S, Gas N, Lechner J, Hurt E, Tschochner H: (2003b). "A Noc complex specifically involved in the formation and nuclear export of ribosomal 40 S subunits." J Biol Chem **278**(6): 4027-81.

Minvielle-Sebastia L, Preker PJ, Wiederkehr T, Strahm Y, Keller W: (1997). "The major yeast poly(A)-binding protein is associated with cleavage factor IA and functions in premessenger RNA 3'-end formation." Proc Natl Acad Sci U S A. **94**(15): 7897-902.

- Moore MJ, Schwartzfarb EM, Silver PA, Yu MC: (2003). "Differential Recruitment of the Splicing Machinery during Transcription Predicts Genome-Wide Patterns of mRNA Splicing." Molecular Cell **24**: 903-915.
- Moroianu J, Blobel G, Radu A: (1995) 92: 2008-2011 (1995). "Previously identified protein of uncertain function is karyopherin alpha and together with karyopherin beta docks import substrate at nuclear pore complexes." Proc Natl Acad Sci USA **92**: 2008-2011.
- Morris DP, Greenleaf AL: (2000). "The splicing factor, Prp40, binds the phosphorylated carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II." J Biol Chem. **275**(51): 39935-43.
- Musunuru K: (2003). "Cell-specific RNA-binding proteins in human disease." Trends Cardiovasc Med. **13**(5): 188-95.
- Neugebauer KM: (2002). "On the importance of being co-transcriptional." Journal of Cell Science **115**: 3865-3871.
- Neville M, Rosbash M: (1999). "The NES-Crm1p export pathway is not a major mRNA export route in *Saccharomyces cerevisiae*." EMBO J. **18**(13): 3746-56.
- Nissan TA, Bassler J, Petfalski E, Tollervey D, Hurt E: (2002). "60S pre-ribosome formation viewed from assembly in the nucleolus until export to the cytoplasm." EMBO J **21**(20): 5539-47.
- Nissan TA, Galani K, Maco B, Tollervey D, Aebi U, Hurt E: (2004). "A pre-ribosome with a tadpole-like structure functions in ATP-dependent maturation of 60S subunits." Mol Cell. **15**(2): 295-301.
- Ohno M, Shimura Y: (1996). "A human RNA helicase-like protein, HRH1, facilitates nuclear export of spliced mRNA by releasing the RNA from the spliceosome." Genes Dev. **10**(8): 997-1007.
- Osheim YN, Miller OL Jr, Beyer AL: (1985). "RNP particles at splice junction sequences on *Drosophila* chorion transcripts." Cell. 1985 Nov; **43**(1): 143-51.
- Palancade B, Zuccolo M, Loeillet S, Nicolas A, Doye V: (2005). "Pml39, a novel protein of the nuclear periphery required for nuclear retention of improper messenger ribonucleoparticles." Mol Biol Cell. **16**(11): 5258-68.
- Palmeri D, Malim M: (1999). "Importin beta can mediate the nuclear import of an arginine-rich nuclear localization signal in the absence of importin alpha." Mol Cell Biol **19**: 1218-1225.
- Pang T-L, Wang C-Y, Hsu C-L, Chen M-Y, Lin J-J: (2003). "Exposure of single-stranded telomeric DNA causes G2/M cell cycle arrest in *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **278**: 9318-9321.
- Panté N, Aebi U: (1996). "Sequential binding of import ligands to distinct nucleopore regions during their nuclear import." Science **273**(5282): 1729-32.
- Pestova TV, Lomakin IB, Lee JH, Choi SK, Dever TE, Hellen CU: (2000). "The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B." Nature **403**(6767): 332-5.

- Piruat JI, Aguilera A: (1998). "A novel yeast gene, THO2, is involved in RNA pol II transcription and provides new evidence for transcriptional elongation-associated recombination." EMBO J. **17**(16): 4859-72.
- Porat Z, Erez O, Kahana C: (2006). "Cellular localization and phosphorylation of Hrb1p is independent of Sky1p." Biochim Biophys Acta. **1763**(2): 207-13.
- Preker PJ, Kim KS, Guthrie C: (2002). "Expression of the essential mRNA export factor Yra1p is autoregulated by a splicing-dependent mechanism." RNA. 2002 August; **8**(8): 969–980. **8**(8): 969-980.
- Query CC, Konarska MM: (2004). "Suppression of multiple substrate mutations by spliceosomal prp8 alleles suggests functional correlations with ribosomal ambiguity mutants." Mol Cell. **14**(3): 343-54.
- Rader SD, Guthrie C: (2002). "A conserved Lsm-interaction motif in Prp24 required for efficient U4/U6 di-snRNP formation." RNA. **8**(11): 1378-92.
- Raghunathan PL, Guthrie C: (1998). "A spliceosomal recycling factor that reanneals U4 and U6 small nuclear ribonucleoprotein particles." Science. **279**(5352): 857-60.
- Rasmussen EB, Lis JT: (1993). "In vivo transcriptional pausing and cap formation on three Drosophila heat shock genes." PNAS **90**(17): 7923-7.
- Reed R, Cheng H: (2005). "TREX, SR proteins and export of mRNA." Current Opinion in Cell Biology **17**(3): 269-273
- Reed R, Hurt E: (2002). "A conserved mRNA export machinery coupled to pre-mRNA splicing." Cell. **108**(4): 523-31.
- Ribbeck K, Görlich D: (2001). "Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. 20:1320-1330." EMBO J **20**: 1320-1330.
- Roderick Y, Lim H, Aebi U, Fahrenkrog B: (2008). "Towards reconciling structure and function in the nuclear pore complex." Histochem Cell Biol. **129**(2): 105-116.
- Rodríguez-Navarro S, Fischer T, Luo MJ, Antúnez O, Brettschneider S, Lechner J, Pérez-Ortín JE, Reed R, Hurt E: (2004). "Sus1, a functional component of the SAGA histone acetylase complex and the nuclear pore-associated mRNA export machinery." Cell. **116**(1): 75-86.
- Rondón AG, Jimeno S, García-Rubio M, Aguilera A: (2003). "Molecular evidence that the eukaryotic THO/TREX complex is required for efficient transcription elongation." J Biol Chem. **278**(40): 39037-43.
- Rose MD, Winston F, Hieter P: (1990). "Methods in yeast genetics. A laboratory course manual." Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Rougemaille M, Dieppois G, Kisseleva-Romanova E, Gudipati RK, Lemoine S, Blugeon C, Boulay J, Jensen TH, Stutz F, Devaux F, Libri D: (2008). "THO/Sub2p functions to coordinate 3'-end processing with gene-nuclear pore association." Cell. **135**(2): 308-21.

- Rout MP, Aitchison JD, Suprpto A, Hjertaas K, Zhao Y, Chait BT: (2000). "The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism." J Cell Biol **148**(4): 635-51.
- Rout MP, Blobel G: (1993). "Isolation of the yeast nuclear pore complex." J Cell Biol **123**(4): 771-83.
- Rutherford SA, Goldberg MW, Allen TD: (1997). "Three-dimensional visualization of the route of protein import: the role of nuclear pore complex substructures." Exp Cell Res. **232**(1): 146-60.
- Rutz B, Séraphin B: (1999). "Transient interaction of BBP/ScSF1 and Mud2 with the splicing machinery affects the kinetics of spliceosome assembly." RNA. **5**(6): 819-3.
- Salditt-Georgieff M, Harpold M, Sawicki S, Nevins J, Darnell JE Jr: (1980). "Addition of poly(A) to nuclear RNA occurs soon after RNA synthesis." J Cell Biol. **86**(3): 844-8.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: (1989) (1989). "Molecular Cloning: a laboratory manual." Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanford JR, Ellis JD, Cazalla D, Cáceres JF: (2005). "Reversible phosphorylation differentially affects nuclear and cytoplasmic functions of splicing factor 2/alternative splicing factor." Proc Natl Acad Sci U S A. **102**(42): 15042-7.
- Sanford JR, Gray NK, Beckmann K, Cáceres JF: (2004). "A novel role for shuttling SR proteins in mRNA translation." Genes Dev. **18**(7): 755-68.
- Sapra AK, Ankö ML, Grishina I, Lorenz M, Pabis M, Poser I, Rollins J, Weiland EM, Neugebauer KM: (2009). "SR protein family members display diverse activities in the formation of nascent and mature mRNPs in vivo." Mol Cell. **34**(2): 179-90.
- Sawa H, Abelson J: (1992). "Evidence for a base-pairing interaction between U6 small nuclear RNA and 5' splice site during the splicing reaction in yeast." Proc Natl Acad Sci U S A. **89**(23): 11269-73.
- Schacherer J, Ruderfer D, Gresham D, Dolinski K, Botstein D, Kruglyak L: (2007). "Genome-wide analysis of nucleotide-level variation in commonly used *Saccharomyces cerevisiae* strains." PLoS ONE **2**(3): e322.
- Schafer T, Strauss D, Petfalski E, Tollervey D, Hurt E: (2003). "The path from nucleolar 90S to cytoplasmic 40S pre-ribosomes." EMBO J **22**(6): 1370-80.
- Schwer B, Guthrie C: (1998). "Prp22, a DExH-box RNA helicase, plays two distinct roles in yeast pre-mRNA splicing." EMBO J **17**(7): 2086-94.
- Searfoss A, Dever T, Wickner R: (2001). "Linking the 3' Poly(A) Tail to the Subunit Joining Step of Translation Initiation: Relations of Pab1p, Eukaryotic Translation Initiation Factor 5B (Fun12p), and Ski2p-Slh1p " Molecular and Cellular Biology **21**(15): 4900-08.
- Segref A, Sharma K, Doye V, Hellwig A, Huber J, Lührmann R, Hurt E: (1997). "Mex67p, a novel factor for nuclear mRNA export, binds to both poly(A)⁺ RNA and nuclear pores." EMBO J. **16**(11): 256-71.

- Senger B, Simos G, Bischoff FR, Podtelejnikov A, Mann M, Hurt E: (1998). "Mtr10p functions as a nuclear import receptor for the mRNA-binding protein Npl3p." EMBO J **17**: 2196-2207.
- Shen EC, Henry M, Weiss VH, Valentini SR, Silver PA, Lee MS: (1998). "Arginine methylation facilitates the nuclear export of hnRNP proteins " Genes Dev. **12**: 679-691.
- Shen EC, Stage-Zimmermann T, Chui P, Silver PA: (1996). "The yeast mRNA-binding protein Npl3p interacts with the cap-binding complex." 2000 Aug 4;275(31):23718-24. 275(31): 23718-24.
- Shen H, Green MR: (2006). "RS domains contact splicing signals and promote splicing by a common mechanism in yeast through humans." Genes Dev. **20**(13): 1755-65.
- Shen H, Kan JL, Green MR: (2004). "Arginine-serine-rich domains bound at splicing enhancers contact the branchpoint to promote prespliceosome assembly." Mol Cell. **13**(3): 367-76.
- Shin BS, Dever TE: (2007). "Molecular genetic structure-function analysis of translation initiation factor eIF5B." Methods Enzymol **429**: 185-201
- Shin BS, Kim JR, Acker MG, Maher KN, Lorsch JR, Dever TE: (2009). "rRNA Suppressor of an eukaryotic translation initiation factor 5B/initiation factor 2 mutant reveals a binding site for translational GTPases on the small ribosomal subunit." Mol Cell Biol. **29**(3): 808-21.
- Siebel CW, Feng L, Guthrie C, Fu XD: (1999). "Conservation in budding yeast of a kinase specific for SR splicing factors." Proc Natl Acad Sci U S A. **96**(10): 544-5.
- Siomi H, Dreyfuss G: (1995). "A nuclear localization domain in the hnRNP A1 protein." J Cell Biol. **129**(3): 551-60.
- Smith A, Brownswell A, Macara IG: (1998). "Nuclear import of Ran is mediated by the transport factor NTF2." Curr Biol **8**: 1403-1406.
- Smith TF, Gaitatzes C, Saxena K, Neer EJ: (1999). "The WD repeat: a common architecture for diverse functions." Trends Biochem Sci. **24**(5): 181-85.
- Staley JP, Guthrie C: (1999). "An RNA switch at the 5' splice site requires ATP and the DEAD box protein Prp28p." Mol Cell. **3**(1): 55-64.
- Stamm S, Ben-Ari S, Rafalska I, Tang Y, Zhang Z, Toiber D, Thanaraj TA, Soreq H: (2005). "Function of alternative splicing." Gene. **344**: 1-20.
- Stickeler E, Kittrell F, Medina D, Berget SM: (1999). "Stage-specific changes in SR splicing factors and alternative splicing in mammary tumorigenesis." Oncogene **18**(24): 3574-82.
- Stoffler D, Feja B, Aebi U: (1999). "The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics." Curr Opin Cell Biol **11**(3): 391-401.
- Stoffler D, Feja B, Fahrenkrog B, Walz J, Typke D, Aebi U: (2003). "Cryo-electrontomography provides novel insights into nuclear pore architecture: implications for nucleocytoplasmic transport." J Mol Biol **328**(1): 119-30.

- Stoilov P, Meshorer E, Gencheva M, Glick D, Soreq H, Stamm S: (2002). "Defects in pre-mRNA processing as causes of and predisposition to diseases." DNA Cell Biol. **1**(11): 803-18.
- Strambio de Castilla C, Blobel G, Rout M: (1999). "Proteins connecting the nuclear pore complex with the nuclear interior." J. Cell Biol. **144**(5): 839.
- Strässer K, Hurt E: (2000). "Yra1p, a conserved nuclear RNA-binding protein, interacts directly with Mex67p and is required for mRNA export." EMBO J. **19**(3): 410-20.
- Strässer K, Hurt E: (2001). "Splicing factor Sub2p is required for nuclear mRNA export through its interaction with Yra1p." Nature. **413**(6856): 648-52.
- Strässer K, Masuda S, Mason P, Pfannstiel J, Oppizzi M, Rodriguez-Navarro S, Rondón AR, Aguilerak A, Struhl K, Reed R, Hurt E: (2002). "TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export." Nature **417**: 304-308.
- Strom AC, Weis K: (2001). "Importin-beta-like nuclear transport receptors." Genome Biol **2:reviews** **3008**: 1-9.
- Stutz F, Bachi A, Doerks T, Braun IC, Séraphin B, Wilm M, Bork P, Izaurralde E: (2000). "REF, an evolutionary conserved family of hnRNP-like proteins, interacts with TAP/Mex67p and participates in mRNA nuclear export." RNA **6**(4): 638-50.
- Stutz F, Izaurralde E: (2003). "The interplay of nuclear mRNP assembly, mRNA surveillance and export." Trends Cell Biol. **13**(6): 319-27.
- Tan EM, Kunkel HG: (1966). „Characteristics of a soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with systemic lupus erythematosus." J Immunol. **96**: 464-471.
- Tanaka N, Aronova A, Schwer B: (2007). „Ntr1 activates the Prp43 helicase to trigger release of lariat-intron from the spliceosome." Genes Dev. **21**(18): 2312-25.
- Tarn WY, Steitz JA: (1994). "SR proteins can compensate for the loss of U1 snRNP functions *in vitro*." Genes Dev. **8**(22): 2704-17.
- Tenenbaum SA, Aguirre-Ghiso J: (2005). "Dephosphorylation shows SR proteins the way out." Mol Cell. **20**(4): 499-501.
- Thomas F, Kutay U: (2003). "Biogenesis and nuclear export of ribosomal subunits in higher eukaryotes depend on the CRM1 export pathway." J Cell Sci **116**: 2409-2419.
- Thomsen R, Libri D, Boulay J, Rosbash M, Jensen TH: (2003). "Localization of nuclear retained mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*." RNA **9**: 1049-1057.
- Tran EJ, Wente SR: (2006). "Dynamic nuclear pore complexes: life on the edge." Cell **125**(6): 1041-53.
- Trapman J, Retèl J, Planta RJ: (1975). "Ribosomal precursor particles from yeast." Exp Cell Res. **90**(1): 95-104.
- Trotta CR, Lund E, Kahan L, Johnson AW, Dahlberg JE: (2003). "Coordinated nuclear export of 60S ribosomal subunits and NMD3 in vertebrates." EMBO J. **22**(11): 2841-51.

- Truant R, Cullen BR: (1999). "The arginine-rich domains present in human immunodeficiency virus type 1 Tat and Rev function as direct importin beta-dependent nuclear localization signals. ." Mol Cell Biol **19**: 1210-1217.
- Tschochner H, Hurt E: (2003). "Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm." Trends Cell Biol. **13**(5): 255-63.
- Umen JG, Guthrie C: (1995). "The second catalytic step of pre-mRNA splicing." RNA. **1**(9): 869-85.
- Umen JG, Guthrie C: (1996). "Mutagenesis of the yeast gene PRP8 reveals domains governing the specificity and fidelity of 3' splice site selection." Genetics **143**(2): 723-39.
- Valentini SR, Weiss V, Silver PA: (1999). "Arginine methylation and binding of Hrp1p to the efficiency element for mRNA 3'-end formation." RNA. **5**(2): 272-80.
- Vinciguerra P, Iglesias N, Camblong J, Zenklusen D, Stutz F: (2005). "Perinuclear Mlp proteins downregulate gene expression in response to a defect in mRNA export." EMBO J. **24**(4): 813-23.
- Visa N, Izaurralde E, Ferreira J, Daneholt B, Mattaj IW: (1996). "A nuclear cap-binding complex binds Balbiani ring pre-mRNA cotranscriptionally and accompanies the ribonucleoprotein particle during nuclear export." J Cell Biol. **133**(1): 5-14.
- Wahl MC, Will C, Lührmann R: (2009). "The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine." Cell. **136**(4): 701-18.
- Wang G, Cooper T: (2007). "Splicing in Disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery." Nat Rev Genet. **8**(10): 749-61.
- Weighardt F, Biamonti G, Riva S: (1995). "Nucleo-cytoplasmic distribution of human hnRNP proteins: a search for the targeting domains in hnRNP A1." J Cell Sci. **108**: 545-55.
- West M, Hedges JB, Chen A, Johnson AW: (2005). "Defining the order in which Nmd3p and Rpl10p load onto nascent 60S ribosomal subunits." Mol Cell Biol **25**(9): 3802-13.
- West M, Hedges JB, Lo KY, Johnson AW: (2007). "Novel interaction of the 60S ribosomal subunit export adapter Nmd3 at the nuclear pore complex." J Biol Chem. **282**(19): 14028-37.
- Will CL, Lührmann R: (2001). "Spliceosomal U snRNP biogenesis, structure and function." Curr Opin Cell Biol. **13**(3): 290-301.
- Windgassen M, Krebber H: (2003). "Identification of Gbp2 as a novel poly(A)+ RNA-binding protein involved in the cytoplasmic delivery of messenger RNAs in yeast." EMBO Rep **4**(3): 278-83.
- Windgassen M, Sturm D, Cajigas IJ, González CI, Seedorf M, Bastians H, Krebber H: (2004). "Yeast shuttling SR proteins Npl3p, Gbp2p, and Hrb1p are part of the translating mRNPs, and Npl3p can function as a translational repressor." Mol Cell Biol. **24** (23): 10479-10491.
- Winzler EA: (1999). "Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. " Science **285**(5429): 901-6.

- Wu JY, Maniatis T: (1993). "Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing." Cell. **75**(6): 1061-70.
- Wuarin J, Schibler U: (1994). "Physical isolation of nascent RNA chains transcribed by RNA polymerase II: evidence for cotranscriptional splicing." Mol Cell Biol. **14**(11): 7219-25.
- Xiao SH, Manley JL: (1997). "Phosphorylation of the ASF/SF2 RS domain affects both protein-protein and protein-RNA interactions and is necessary for splicing." Genes Dev. **11**(3): 334-44.
- Xu YZ, Newnham CM, Kameoka S, Huang T, Konarska MM, Query CC.: (2004). "Prp5 bridges U1 and U2 snRNPs and enables stable U2 snRNP association with intron RNA." EMBO J. **23**(2): 367-85.
- Yamaguchi Y, Narita T, Inukai N, Wada T, Handa H: (2001). "SPT genes: key players in the regulation of transcription, chromatin structure and other cellular processes." J Biochem. **129**(2): 185-91.
- Yao W, Lutzmann M, Hurt E: (2008). "A versatile interaction platform on the Mex67-Mtr2 receptor creates an overlap between mRNA and ribosome export." EMBO J **27**(1): 6-16.
- Yao W, Roser D, Kohler A, Bradatsch B, Bassler J, Hurt E: (2007). "Nuclear export of ribosomal 60S subunits by the general mRNA export receptor Mex67-Mtr2." Mol Cell **26**(1): 51-62.
- Yassour M, Kaplan T, Fraser HB, Levin JZ, Pfiffner J, Adiconis X, Schroth G, Luo S, Khrebukova I, Gnirke A, Nusbaum C, Thompson DA, Friedman N, Regev A: (2009). "Ab initio construction of a eukaryotic transcriptome by massively parallel mRNA sequencing." Proc Natl Acad Sci U S A. **106**(9): 3264-9.
- Yeakley JM, Tronchère H, Olesen J, Dyck JA, Wang HY, Fu XD: (1999). "Phosphorylation regulates in vivo interaction and molecular targeting of serine/arginine-rich pre-mRNA splicing factors." J Cell Biol. **124**(3): 447-55.
- Yeh LC, Lee JC: (1998). "Yeast ribosomal proteins L4, L17, L20, and L25 exhibit different binding characteristics for the yeast 35S precursor rRNA." Biochim Biophys Acta **1443**(1-2): 139-48.
- Yun CY, Fu XD: (2000). "Conserved SR protein kinase functions in nuclear import and its action is counteracted by arginine methylation in *Saccharomyces cerevisiae*." J Cell Biol. **150**(4): 707-18.
- Zemp I, Kutay U: (2007). "Nuclear export and cytoplasmic maturation of ribosomal subunits." FEBS Lett. **581**(15): 2783-93.
- Zenklusen D, Vinciguerra P, Strahm Y, Stutz F: (2001). "The yeast hnRNP-Like proteins Yra1p and Yra2p participate in mRNA export through interaction with Mex67p." Mol Cell Biol. **21**(13): 4219-32.
- Zhang L, Shen J, Guanieri MT, Heroux A, Yang K, Zhao R: (2007). "Crystal structure of the C-terminal domain of splicing factor Prp8 carrying retinitis pigmentosa mutants." Protein Science **16**: 1024–1031.

Zhang M, Green M: (2001). "Identification and characterization of yUAP/Sub2p, a yeast homolog of the essential human pre-mRNA splicing factor hUAP56." Genes Dev **15**(1): 30-5

Zhang X, Schwer B: (1997). "Functional and physical interaction between the yeast splicing factors Slu7 and Prp18." Nucleic Acids Res. **25**(11): 2146-52.

Zhou Z, Reed R: (1998). "Human homologs of yeast Prp16 and Prp17 reveal conservation of the mechanism for catalytic step II of pre-mRNA splicing." EMBO J. **17**(7): 2095-106.

6. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|--|
| α | Alpha |
| ^{32}P | Radioaktiv markiertes Phosphatatom |
| $^{\circ}\text{C}$ | Grad Celsius |
| μ | Mikro (10^{-6}) |
| Δ | Deletion („knock-out“) |
| A | Adenosin |
| A | Ampere |
| Abb. | Abbildung |
| ADP | Adenosdiphosphat |
| Amp | Ampicillin |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| aRNA | Amplifizierte RNA |
| AS | Aminosäure(n) |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BBP | „Branch point binding protein“ |
| | Bindeprotein des Verzweigungspunkt |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Rinderserumalbumin Fraktion V |
| bzw. | beziehungsweise |
| c | Zenti (10^{-2}) |
| C | Cytidin |
| ca. | Circa |
| CBC | „Cap-binding complex“ |
| | (Kappenbindungskomplex) |
| Ci | Curie |
| cm^2 | Quadratzenimeter |
| cpm | „Counts per minute“ |
| | (Zähleinheiten pro Minute) |
| Da | Dalton |
| DAPI | 4',6-Diamidino-2-phenylindol |
| ddH ₂ O | Bidestilliertes Wasser |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | „Deoxyribonucleic Acid“ |
| | (Desoxyribonukleinsäure, DNS) |
| dNTP | Desoxy-Nukleosidtriphosphat |
| dT | Desoxy-Thymidin |
| DTT | Dithiothreitol |
| EJC | „Exon junction complex“ |
| EMS | Ethylmethansulfonat |
| ESE | „Exon splice enhancer“ (Exon-Spleißverstärker) |
| <i>et al.</i> | Und andere |
| ETS | Externe transkribierte Bereiche |
| Fc " | „Fragment of constant region“ |
| FISH | Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung |
| FOA | „5-fluoroorotic acid“ (5-Fluoroorotsäure) |
| g | Erdbeschleunigung = 9.81 m/s ² |
| g | Gramm |
| gDNA | Genomische DNA |
| GDP | Guanosindiphosphat |

| | |
|-----------|--|
| G | Guanosin |
| GFP | „green fluorescent protein“ (grün fluoreszierendes Protein) |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| h | Stunde(n) |
| HIS | Histidin |
| HRP | „Horseradish peroxidase“ (Meerrettich Peroxidase) |
| i. d. R. | In der Regel |
| IgG | Immunglobulin G |
| IP | Immunopräzipitation |
| IPTG | Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid |
| ITS | Interne transkribierte Bereiche |
| k | kilo (10 ³) |
| kb | Kilobasen |
| Ko-IP | Ko-Immunopräzipitation |
| L | Liter |
| LB-Medium | Luria-Bertani-Medium |
| LEU | Leuzin |
| LiOAc | Lithiumacetat |
| M | Molar |
| M | Mega (10 ⁶) |
| m | Meter |
| m | Milli (10 ⁻³) |
| min | Minute(n) |
| mol | Mol |
| myc | Myelocytomatose Protein |
| mRNA | „Messenger“-RNA (Boten-RNA) |
| mRNP | „Messenger“-RNP |
| n | Nano (10 ⁻⁹) |
| NES | „Nuclear export signal“ (Nukleäres Exportsignal) |
| NLS | „Nuclear localization signal“ (nukleäres Lokalisierungssignal) |
| NMD | „Nonsense-mediated mRNA decay“ |
| NPC | „Nuclear pore complex“ (Kernporenkomplex) |
| Nt | Nukleotide |
| OD | „Optical density“ (optische Dichte) |
| ONPG | o-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid |
| ORF | „Open reading frame“ (offener Leserahmen) |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PCR | „Polymerase chain reaction“ (Polymerasekettenreaktion) |
| PEG | Polyethylenglykol |
| PBS | „Phosphat buffer solution“ (Phosphat- Gepufferte Salzlösung) |
| PBSMKT | Phosphat-gepufferte Salzlösung mit MgCl ₂ , KCl und Triton X-100 |
| pH | Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| rDNA | Ribosomale DNA |
| RNA | Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure, RNS) |
| RNase A | Ribonuklease A |

| | |
|------------|---|
| RNP | Ribonucleoprotein particle (Ribonukleoproteinpartikel) |
| RRM | „RNA recognition motif“ (RNA- Erkennungsmotiv) |
| rRNA | Ribosomale RNA |
| RT | Raumtemperatur |
| RT-PCR | Reverse Transkriptase-PCR |
| sec | Sekunde |
| SD-Medium | „Synthetic dropout medium“ |
| SDS | „Sodiumdodecylsulfat“ (Natriumdodecylsulfat) |
| snRNP | „Small nuclear RNP“ |
| SS | „Splice site“ (Spleiß-Stelle) |
| SSC | Saline sodium citrate (salzhaltiges Natriumcitrat) |
| ssDNA | „salmon sperm DNA“ (Lachssperma DNA) |
| Tab. | Tabelle |
| TAE | Tris/Essigsäure (Acetat)/EDTA-Puffer |
| TAP | „Tandem affinity purification“ (Tandem Affinitätsaufreinigung) |
| TBS | „Tris buffered saline“ (TRIS-gepufferte Salzlösung) |
| TBST | TRIS-gepufferte Salzlösung mit Tween-20 |
| TE | Tris/EDTA-Puffer |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin |
| TRP | Tryptophan |
| Tris | Tris-hydroxymethyl-aminomethan |
| tRNA | „Transfer RNA“ |
| ts | Temperatur sensitiv |
| U | Units |
| U | Uridin |
| Upm | Umdrehung(en) pro Minute |
| URA | Uracil |
| UTR | „Untranslated region“ (untranslatierte Region) |
| UV | Ultraviolett |
| ÜN | Über Nacht |
| Upm | Umdrehung(en) pro Minute |
| V | Volt |
| v/v | „Volume per volume“ (Volumen pro Volumen) |
| WT | Wildtyp |
| w/v | „Weight per volume“ (Gewicht pro Volumen) |
| X-Gal | 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galacto- pyranosid |
| YPD-Medium | „Yeast extract peptone dextrose medium“ (Hefevollmedium) |
| z.B. | Zum Beispiel |

7. Zusammenfassung

Eukaryontische Zellen zeichnen sich durch ihre Kompartimentierung in Zytoplasma und Zellkern aus, welche eine regulierte Genexpression ermöglicht. Im Zellkern erfolgt die Transkription der Gene in prä-mRNAs, die nach extensiver Prozessierung zur Export kompetenten mRNA im Ribonukleoprotein-Komplex („messenger ribonucleoprotein particle“ =mRNP) heranreifen. Die SR-ähnlichen mRNA Bindeproteine Npl3p, Gbp2p und Hrb1p assoziieren während der Transkription mit der mRNA im Zellkern und Npl3p interagiert mit dem Export Rezeptor Mex67p-Mtr2p, der die Export-kompetente mRNA durch die Kernporen-Komplexe der Kernmembran in das Zytoplasma transportiert. Dort erfolgt an den Ribosomen die Proteintranslation anhand der mRNA kodierten genetischen Information.

Npl3p ist in einigen *Saccharomyces cerevisiae* Stämmen ein essentielles Protein und Mutationen führen zu mRNA Export-Defekten. In einem weltweiten Deletionsprojekt wurde eine überlebensfähige *NPL3*-Deletion im Stammhintergrund *BY4741* hergestellt. *npl3Δ*-Zellen zeigen einen temperatursensitiven Wachstumsdefekt. Interessanterweise sind in *npl3Δ* keine signifikanten mRNA Export Defekte vorhanden, was auf eine weitere, bisher unbekannte Funktion von *NPL3* hindeutet. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigen, dass eine *NPL3* Deletion weder zu Transkriptions- noch zu Prozessierungsdefekten von mRNA oder rRNA führt. Es wurden lediglich marginale Spleißing-Defekte detektiert. In Lokalisationsstudien wurden jedoch nukleäre Export-Defekte der ribosomalen prä-60S, nicht aber der 40S Untereinheit in *npl3Δ*-Zellen identifiziert. Npl3p interagiert sowohl über eine starke Protein-Protein Wechselwirkung mit dem ribosomalen Protein Rpl25p als auch über eine Bindung der 25S rRNA mit der prä-60S Untereinheit. Die Interaktion von Npl3p beginnt offenbar in der Frühphase der Ribosomen-Biogenese im Nukleolus, da auch eine Bindung mit der nukleolaren 35S rRNA des prä-90S Ribosoms für Npl3p identifiziert wurde. Eine Funktion von Npl3p in der Prozessierung des prä-90S Ribosoms ist aufgrund von in *npl3Δ* nicht detektierten rRNA Prozessierungsdefekten und nukleolaren Mislokalisationen von Rpl25p unwahrscheinlich. Npl3p interagiert hingegen physikalisch mit den Komponenten des Export kompetenten prä-60S Komplexes Nmd3p und dem ebenfalls im prä-60S Export agierenden Export-Rezeptor Mex67p. Npl3p übernimmt jedoch nicht die Funktion des Adapters für diese Faktoren. Eine *NPL3* Deletion hat keinen Einfluß auf die zwischen Nmd3p (diese Arbeit) oder Mex67p (Daten Thomas Gross) bestehenden Interaktionen mit der prä-60S Untereinheit. Da Npl3p mit dem ribosomalen Protein der prä-60S Untereinheit Rpl25p und der 25S rRNA direkt interagiert und seine Deletion zu nukleären Export Defekten der prä-60S Untereinheit führt, kann Npl3p auch als unabhängiger Exportadapter im Transportprozess der prä-60S Untereinheit wirken. Npl3p hat das Potential den Kontakt zwischen diesem Makromolekül und den Kernporen-Komplexen über eine Direktinteraktion mit dem Nup60p assoziierten Mlp1p zu vermitteln.

Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit konnte ein Beitrag zur Charakterisierung von Exporteigenschaften der SR-ähnlichen mRNA Bindeproteine Gbp2p und Hrb1p geleistet werden, der erstmalig eine Verbindung zum Spleißing-Prozess aufzeigt. In einem „Screen“, der nach Faktoren sucht, die nukleäre Export-Defekte für Gbp2p bewirken, wurden die Spleißingfaktor-Mutanten *prp8-908/988* und *prp17-Q336** identifiziert, die auch zu Export-Defekten von Hrb1p, nicht aber von Npl3p führen. *GBP2* und *HRB1* Deletionen interagieren genetisch mit diesen Spleißingfaktor-Mutanten, während eine *NPL3* Deletion weder genetisch noch physikalisch eine Interaktion mit diesen Faktoren zeigt. Protein-Protein-Wechselwirkungen wurden dagegen für Gbp2p und Hrb1p mit dem im zweiten Spleißing-Schritt involvierten Prp17p und mit Prp43p des postspleißosomalen Komplexes detektiert. Interessanterweise ist die mRNA Bindung von Gbp2p und Hrb1p in *prp8-908/988*, *prp17Δ* und *prp43-S247A* stark reduziert, nicht jedoch von Npl3p. Für Gbp2p und Hrb1p wurden in RIP-Chip und qRT-PCR-Studien eine präferentielle Bindung von gespleißten mRNAs identifiziert. Insbesondere die Doppel-Deletion aus *gbp2Δ hrb1Δ* zeigt leichte Spleißing-Defekte und führt zu reduzierten Proteinexpressionen Intron-haltiger Reportergene. Gbp2p und Hrb1p interagieren mit dem Export-Rezeptor Mex67p und sind somit als mRNA Export Adaptoren neu identifiziert worden. In Spleißingfaktor-Mutanten sind diese Adapter-Rezeptor Bindungen gestört, wodurch der Export von ungespleißten mRNAs vermutlich zurückgehalten wird. Gbp2p und Hrb1p interagieren mit dem Kernporen-Komplex assoziierten Mlp1p. Dieser Faktor hat eine Funktion in der finalen Qualitätskontrolle von gespleißten mRNAs, die möglicherweise durch eine Interaktion von Mlp1p mit Gbp2p und Hrb1p unterstützt wird.

Daraus ergibt sich folgendes Modell: Gbp2p und Hrb1p werden Spleißing-abhängig zur mRNA rekrutiert und unterstützen den Export von gespleißten mRNAs über eine Interaktion mit dem Export-Rezeptor Mex67p. Im Gegensatz dazu ist Npl3p ein genereller mRNA Export-Adapter, der unabhängig vom Intron-Status der mRNA mit Mex67p interagiert. Npl3p wird während der Transkriptionsinitiation über die RNA Polymerase II auf alle mRNAs geladen. Gbp2p und Hrb1p gelangen während der Elongationsphase über den THO-Komplex zur mRNA. Eine stabile Bindung von Gbp2p und Hrb1p mit der mRNA erfolgt erst durch die Assoziation des Spleißosom, mit dessen Komponenten der Spleißing-Spätphase Gbp2p und Hrb1p physikalisch interagieren. Diese Wechselwirkungen unterstützen Spleißing und ermöglichen über die sich anschließende Adapter-Rezeptor Interaktion die Rekrutierung von weiteren Mex67p-Molekülen für einen effizienten Export gespleißter mRNAs. Vor dem Translokationsprozess werden gespleißte mRNAs über eine finale Qualitätskontrolle an den Kernporen-Komplexen überprüft, die durch eine Interaktion von Gbp2p und Hrb1p mit dem Kernporen-Komplex assoziierten Mlp1p unterstützt wird.

8. Summary

In eukaryotic cells the separation into a nuclear and cytoplasmic compartment leads to an advantage for regulation of an efficient gene expression. Gene expression starts in the nucleus with the transcription of DNA to premature mRNAs. These transcripts are extensively processed and mature to the export competent mRNA within the messenger ribonucleoprotein particle (mRNP). Three mRNA binding SR-like proteins Npl3p, Gbp2p, and Hrb1p are loaded co-transcriptionally onto the mRNA and Npl3p interacts with the export receptor Mex67p-Mtr2p which translocates the processed and export competent mRNA through the nuclear pore complexes into the cytoplasm. Once in the cytoplasm the mRNA encoded genetic information is translated into protein at the ribosomes.

In general, *NPL3* is essential in most yeast strains and *npl3* mutants lead to mRNA export defects. However, in a worldwide deletion project a viable *npl3Δ* strain was created in the *BY4741* background. Interestingly, in *npl3Δ* no mRNA export defects were detected, suggesting a further yet unknown function for *NPL3*. However GFP-localization studies of representing reporter proteins revealed a nuclear export defect for the ribosomal pre-60S but not for the 40S subunit in *npl3Δ*. Npl3p physically interacts with the ribosomal protein Rpl25p and binds to the 25S rRNA of the pre-60S subunit. Nevertheless export defects unlikely refer to the nucleolar processing of the 90S preribosome as in *npl3Δ* a nucleolar mislocalization of the early assembled reporter protein Rpl25p was not observed and rRNA processing defects were not detected. In fact, Npl3p physically interacts with pre-60S export adapter Nmd3p and the export receptor Mex67p which marks for the export competent pre-60S subunit for transport into the cytoplasm. Npl3p is not acting as an adapter for these factors as *npl3Δ* does not influence the amount of these bound factors to the pre-60S subunit. Here, we propose a novel function for Npl3p as an independent adapter for the export of the pre-60S subunit as it interacts directly with the ribosomal protein of the pre-60S subunit and a deletion of *NPL3* leads to export defects of the pre-60S subunit in the nucleus. Furthermore Npl3p has the potential to mediate the contact of these macromolecules to the nuclear pore complex via an interaction with the nucleoporin Nup60p associated Mlp1p.

The second part of this thesis leads to a characterization of the export requirements for Gbp2p, Hrb1p and Npl3p. For a first time a yet unknown link to late steps of splicing process was observed for Gbp2p and Hrb1p but not for Npl3p.

Primarily, in a screen the splicing factor mutants *prp8-908/988* and *prp17-Q336** were identified, that lead to nuclear export defects for Gbp2 and Hrb1p but not for Npl3p. *GBP2* and *HRB1* deletion show genetic interactions with these splicing factor mutants in contrast to the deletion of *NPL3* which showed neither physical nor genetic interactions. Gbp2p and Hrb1p interact with Prp17p and Prp43p, a factor of the postspliceosomal complex. The nuclear mislocalization of Gbp2p and Hrb1p are effect of a substantially reduced mRNA

binding levels in *prp8-908/988*, *prp17Δ* and *prp43-S247A* while the amount of bound mRNAs to Npl3p only little is affected. RIP-Chip and qRT-PCR analysis revealed a preference for Gbp2p and Hrb1p binding to mRNAs that contain introns. Particularly the double deletion strain *gbp2Δ hrb1Δ* show slight splicing defects but significant reduced protein expression level of intron containing reporter genes. Gbp2p and Hrb1p are novel identified mRNA export adapter for the interaction with the export receptor Mex67p. These adapter-receptor interactions are highly reduced in *prp8-908/988* and *prp17Δ* that may deplete the export of unspliced mRNAs. Furthermore, Gbp2p and Hrb1p interact with the nuclear pore associated Mlp1p which performs a function in the quality control of spliced mRNAs before they leave into the cytoplasm and Gbp2p and Hrb1p may contribute to this final mRNA quality check at the nuclear pores.

These findings lead to following model: Gbp2p and Hrb1p in contrast to Npl3p are recruited to the mRNAs by the splicing machinery and the interaction of Gbp2p and Hrb1p with the export receptor Mex67p promotes the export of spliced mRNAs. Contrary, Npl3p is a general export adapter that interacts regardless of intron status with bulk mRNA and interacts with the mRNA export receptor Mex67p. It is well known that Npl3p is recruited by action of RNA polymerase II to the mRNA during transcription initiation. Gbp2p and Hrb1p are recruited to mRNA during transcription elongation. However, with the co-transcriptional association of the spliceosome, a direct interaction of Gbp2p and Hrb1p with splicing factors of the late splicing phase ascertains a strong binding to spliced mRNAs and allows for the recruitment of Mex67p molecules via physical interactions with Gbp2p and Hrb1p for an efficient and controlled transport of spliced mRNAs.

I. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Alexandra Hackmann
geboren am 03.06.1979 in Haselünne

Schulbildung:

08/1990-07/1999

Gymnasium Marianum Meppen
Abschluss: Abitur

Studium:

1999-2005

Studium der Biologie an der Universität Osnabrück

10/1999-4/2001

Grundstudium

09/2001

Vordiplom

10/2001-07/2004

Hauptstudium
Schwerpunkte: Biochemie, Mikrobiologie,
Angewandte Genetik der Mikroorganismen,
Pflanzenphysiologie, Botanik

07/2004-05/2005

Diplomarbeit in der Abteilung für Pflanzenphysiologie
mit dem Titelthema: „Die Rolle von CP12 in der
Regulation des Calvin-Zyklus in höheren Pflanzen.“

05/2005

Abschluss: Diplom-Biologin
(Sehr gut mit Auszeichnung)

06/2005-11/2005

Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung für
Pflanzenphysiologie an der Universität Osnabrück

Seit 12/2005

Promotion und wissenschaftliche Mitarbeiterin am
Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung der
Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Prof.
H. Krebber mit dem Titelthema: „Vergleichende
Analysen der nukleär/zytoplasmatischen Export-
eigenschaften von SR-ähnlichen Proteinen und ihre
regulatorische Funktion im Spleißing-Prozess.“

II. Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Osnabrück:

Altendorf, Backhausen, Bakker, Bakker-Grunwald, Engelbrecht-Vandré, Hurka, Hochkirch, Holtgrefe, Jeserich, Jung, Junge, Lengeler, Neuffer, Pänke, Reuter, Scheibe, Schrempf, Schröpfer, Walter, Westheide

Und in Marburg:

Krebber

III. Danksagung

Mein besonders herzlicher Dank gilt Frau Prof. H. Krebber für die Bereitstellung der interessanten Themen und Fragestellungen sowie für die wegweisenden Ratschläge und Diskussionen, die zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen. Schließlich danke ich ihr für die Begutachtung dieser Arbeit und die Übernahme des Referats.

Mein Dank gilt des weiteren Prof. Dr. Rolf Müller für die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten, die mir in der Arbeitsgruppe durch ihn zur Verfügung gestellt wurden. Des weiteren danke ich ganz herzlich den „Thesis“ Komitee-Mitgliedern Prof R. Jakob und PD Dr. U. Mühlenhoff.

Für die Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung von Microarrays und Fluoreszenzmessungen möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. Michael Krause, Florian Finkernagel, Dr. Birgit Samans und PD Dr. Uli Mühlenhoff bedanken.

Für die gute Atmosphäre und kooperative Zusammenarbeit möchte ich mich bei allen z.T. ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Krebber bedanken: Haijia Wu, Claudia Baierlein, Lysann Henker, Stephanie Heinrich, Melanie Janning, Thomas Gross, Lydia Schild und allen Mitgliedern der AG Bastians.

Allen Mitgliedern des IMT gilt mein Dank für das angenehme Arbeitsklima und die ständige Hilfsbereitschaft. Ulrike Schülke danke ich für die immer wieder gern angenommene hilfreiche Unterstützung in organisatorischen Fragen.

Gewidmet ist diese Arbeit meiner Mutter, der ich dafür danken möchte, dass sie mir liebevoll zu allen Zeiten Rückhalt und Unterstützung gegeben hat und immer für mich da war. Auch danke ich meiner Oma für Ihre Unterstützung.

IV. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Alexandra Hackmann, ehrenwörtlich, dass ich meine dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Vergleichende Analysen der nukleär/zytoplasmatischen Exporteigenschaften von SR-ähnlichen Proteinen und ihre regulatorische Funktion im mRNA Spleißing-Prozess“

im Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT) der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Heike Krebber (Fachbereich Medizin) ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt. Die vorliegende Arbeit wurde (oder wird) zur Veröffentlichung vorbereitet:

Fachartikel

Hackmann A., Wu H., Heinrich S., Finkernagel F., Samans B., Krebber H.
The shuttling SR-like proteins Gbp2p and Hrb1p mediate the nuclear export of spliced mRNAs.
In Bearbeitung

Hackmann A., Gross T., Baierlein C., Krebber H.
Npl3 functions as a novel export factor for the 60S pre-ribosomal subunit.
Eingereicht

Baierlein C., Gross T., Hackmann A., Forster N., Krebber H.
The mRNA export factor Npl3p functions in subunit joining for translation initiation.
In Bearbeitung

Wu H., Hackmann A., Krebber H.
The order of RNP complex formation prior to export into the cytoplasm.
In Bearbeitung

Poster

Hackmann A., Wu H., Heinrich S., Finkernagel F., Samans B., Krebber H.
The shuttling SR-like proteins Gbp2p and Hrb1p mediate the nuclear export of spliced mRNAs.
EMBL conference in Heidelberg, 18.-20. März 2010
Gross T., Baierlein C., Hackmann A., Forster N., Krebber H.

The mRNA export factor Npl3p functions in subunit joining for translation initiation.
EMBL conference in Heidelberg, 18.-20. September 2009

Vorträge

Hackmann A., Krebber H.

The shuttling SR-like proteins Gbp2p and Hrb1p mediate the nuclear export of spliced mRNAs.

SFB 593 workshop im Kleinwalsertal (Hirschegg), 2-8. Februar 2009

Mechanismen der zellulären Kompartimentierung und deren krankheitsrelevante Veränderungen.

Hackmann A., Krebber H.

Differential export requirements for the shuttling mRNA binding SR-like proteins in Saccharomyces cerevisiae.

RNA Club, Goethe Universität Frankfurt Campus Riedberg, 18. Februar 2009

Marburg, den 15.07.2010

Alexandra Hackmann

A handwritten signature in blue ink, reading "A. Hackmann". The signature is written in a cursive style with a light blue background.